



**Nuno Miguel dos  
Santos Pinto Ferreira**

**Efeitos de Pré-tratamentos de Alta Pressão  
na Viabilidade e Sensibilidade Térmica de  
*Salmonella* spp**



**Nuno Miguel dos  
Santos Pinto Ferreira**

**Efeitos de Pré-tratamentos de Alta Pressão na  
Viabilidade e Sensibilidade Térmica de  
*Salmonella* spp**

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química e Qualidade dos Alimentos, realizada sob a orientação científica da Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, e co-orientação do Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **o júri**

### **presidente:**

Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo  
Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro

### **vogais:**

Doutora Paula Cristina Maia Teixeira  
Professora Auxiliar da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso  
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva  
Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade Aveiro

## **agradecimentos**

não caberiam em meros sons escritos os sentimentos de agradecimento que tenho para todos os que, em maior ou menor grau de intensidade e proximidade, foram meus cúmplices nesta longa caminhada; no entanto, alguns merecem destaque especial:

aos meus orientadores, pela paciência e por não deixarem de acreditar ser possível

ao Departamento de Cerâmica e do Vidro da Universidade de Aveiro e seus funcionários, que viabilizaram o apoio logístico de parte significativa deste trabalho

às colegas de laboratório do Departamento de Biologia, tanto pela amizade como pelo auxílio real para que acontecesse

aos meus pais, pelo incentivo

à Liliana, pelo sorriso por cima do meu ombro

Esta tese é dedicada a ti, Inês, por muito mais que alguma vez concebas

## palavras-chave

Alta Pressão, sensibilidade térmica, *Salmonella*, ovo

## resumo

Recentemente, tem adquirido particular interesse a combinação sequencial de tratamentos de pressão e temperatura, como possibilidade de reduzir o nível de tratamento térmico necessário para pasteurizar alimentos. Nestes tratamentos combinados usam-se pressões até 200 MPa, menores que as usadas quando se pasteuriza um alimento apenas por Alta Pressão - cerca de 400-600 MPa, permitindo usar equipamento menos oneroso, com vantagens económicas muito significativas ao nível do custo final do produto. O objectivo deste trabalho consistiu em estudar e avaliar o efeito da aplicação de Alta Pressão (200 MPa à temperatura ambiente, durante 5, 15 e 30 minutos) na sensibilidade térmica e cinética de inactivação de *Salmonella enteritidis*. Os resultados obtidos mostraram uma clara redução para os valores do factor *D* (entre os 14% e os 64%), quando a inactivação térmica ocorreu imediatamente após os tratamentos de Alta Pressão ( $p < 0,005$ ), em todas as temperaturas testadas. Tempos de pressurização mais longos geraram um efeito mais pronunciado que 5 minutos de pressurização ( $p < 0,02$ ), mas nenhuma diferença foi observada após 15 minutos de pressurização. Estes resultados são bastante promissores para cadeias de produção alimentar em que *Salmonella* spp estejam entre os microrganismos alvo a destruir, dado que se poderá obter o mesmo efeito de inactivação bacteriana com uma redução no binómio tempo/temperatura de processamento, minimizando os efeitos nocivos na qualidade do produto final, quando comparados com o tratamento térmico isolado.

Uma vez que os ovos e os ovoprodutos poderão ser uma das futuras aplicações potenciais deste tipo de processamento, foi realizado um estudo preliminar, com um tratamento sequencial similar, em ovo líquido inteiro inoculado com *S. enteritidis*. Os resultados mostraram um aumento da sensibilidade térmica da estirpe após os tratamentos de Alta Pressão, mas foi igualmente observado um efeito de resistência ao processamento, relacionado com o reduzido número inicial de células, o que sublinha a necessidade de pesquisa adicional, designadamente ao nível da caracterização dos mecanismos envolvidos nos danos celulares.

**key-words**

High Pressure, thermal sensitivity, *Salmonella*, eggs

**abstract**

In recent years, particular attention has been given to the sequential treatment combination of pressure and temperature, in order to reduce the thermal treatment intensity needed to achieve food pasteurization. In these combined processing, the applied pressure is up to 200 MPa, therefore lower than those used to pasteurize by High Pressure only – between 400-600 MPa, allowing more affordable equipment, leading to significant economical benefits in the final product cost. The present study aimed to evaluate High Pressure treatment effects (200 MPa at room temperature, for 5, 15 and 30 minutes) in *Salmonella enteritidis* thermal sensitivity and inactivation kinetics. The results obtained showed a clear reduction in *D* values (between 14% and 64%) when thermal inactivation was carried out immediately after pressure treatments ( $p < 0,005$ ), at all the temperatures tested. Longer pressurization periods showed stronger effects than 5 minutes of pressure treatment ( $p < 0,02$ ), but no differences were observed following a pressurization period of 15 minutes. These results seem quite promising for food production chains in which *Salmonella* spp are the target organisms, since the same bacterial inactivation effect with a reduction on time/processing temperature combination might be obtained, with less damage extent in the food quality, when compared to thermal treatment alone.

Since this is a processing that can potentially be applied to eggs and egg products, a preliminary study with a similar sequential treatment was conducted in liquid whole egg inoculated with *S. enteritidis*. Results showed an increase in the strain's thermal sensitivity after the pressure treatments. Nevertheless, a resistance effect due to the processing, that correlated with the reduced initial cell count, was also observed, stressing the need for further investigation in the mechanisms involved in the cell damage.

# Índice Geral

## I- Introdução

1- O Consumidor Face aos Alimentos	15
2- Novas Tecnologias de Conservação de Alimentos	15
3- Processamento por Alta Pressão em Alimentos	16
4- Mecanismos de Acção da Alta Pressão em Sistemas Biológicos	18
5- O Processamento Combinado Envolvendo Alta Pressão	21
5.1- Alta Pressão e Dióxido de Carbono	22
5.2- Alta Pressão e pH	22
5.3- Alta Pressão e Agentes Antimicrobianos	22
5.4- Alta Pressão e Temperatura	23
6- Relevância de <i>Salmonella</i> spp enquanto Patogénico de Origem Alimentar	23
7- Caracterização da Espécie	25
8- A Salmonelose Associada ao Consumo de Ovos e Ovoprodutos	26
8.1- Composição e Estrutura do Ovo	26
8.2- Contaminação do Ovo por <i>S. enteritidis</i>	31
8.3- Estratégias de Intervenção	32
8.4- Pasteurização de Ovos e Alta Pressão	33
8.5- Resistência ao Processamento	37
8.6- Processamento Combinado Sequencial	39
9- Perspectivas Futuras das Tecnologias Atérmicas	40

## II- Estratégia e Objectivo do Estudo 44

## III- Materiais e Métodos

1- Microrganismo (Cultura Base Utilizada)	45
2- Avaliação do Perfil de Crescimento	45
3- Caracterização da Temperatura no Banho Termostatizado	45
4- Determinação do Tempo de Equilíbrio Térmico	46
5- Ensaio Prévios	
5.1- Ensaio Prévios de Inactivação Térmica	46
5.2- Ensaio Prévios de Inactivação Térmica após Tratamentos de Alta Pressão	47
6- Inactivação Térmica	
6.1- Preparação da Cultura	47
6.2- Determinação da Densidade Óptica	48
6.3- Ensaio de Inactivação Térmica	48
6.4- Diluições, Sementeiras e Contagens	48

<b>7- Tratamentos de Alta Pressão</b>	
<b>7.1- Preparação da Cultura</b>	50
<b>7.2- Tratamentos de Alta Pressão a 200 MPa</b>	50
<b>7.3- Tratamentos de Alta Pressão a 300 MPa</b>	51
<b>8- Ensaio de Inativação Térmica após Tratamentos de Alta Pressão</b>	52
<b>9- Testes em OLI</b>	
<b>9.1- Preparação da Cultura</b>	53
<b>9.2- Preparação do Ovo</b>	53
<b>9.3- Ensaio de Inativação Térmica</b>	54
<b>9.4- Tratamentos de Alta Pressão a 200 MPa</b>	54
<b>9.5- Ensaio de Inativação Térmica após Tratamentos de Alta Pressão</b>	54
<b>10- Análise dos Dados Experimentais</b>	55
<b>10.1- Cálculo da Constante Cinética</b>	56
<b>10.2- Testes de Significância</b>	56
<b>10.3- Cálculo do Factor <i>D</i></b>	57
<b>10.4- Cálculo do factor <i>z</i></b>	58
<b>10.5- Factores <i>D</i> e <i>z</i>, Temperatura e Pressão</b>	59
 <b>IV- Resultados e Discussão</b>	
<b>1- Avaliação do Perfil de Crescimento</b>	60
<b>2- Caracterização da Temperatura no Banho Termostático</b>	61
<b>3- Determinação do Tempo de Equilíbrio Térmico</b>	61
<b>4- Inativação Térmica</b>	62
<b>5- Inativação Térmica após Tratamentos de Alta Pressão</b>	66
<b>6- Inativação Térmica após Tratamentos de Alta Pressão e Conservação Durante 7 Dias a 4°C</b>	72
<b>7- Efeito do Tratamento de Alta Pressão a 300 MPa</b>	76
<b>8- Inativação Térmica em OLI</b>	79
<b>9- Inativação Térmica após Tratamentos de Alta Pressão (OLI)</b>	80
<b>10- Efeito do Número Inicial de Células na Inativação Térmica em OLI</b>	86
 <b>V- Conclusões</b>	90
 <b>Bibliografia</b>	92



## Índice de Gráficos

### CAPÍTULO IV

<b>Gráfico 1.1</b> - Curva de crescimento de <i>S. enteritidis</i> a 37°C	61
<b>Gráfico 4.1</b> - Curvas de inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> (Série A)	63
<b>Gráfico 4.2</b> - Curvas de inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> (Série B)	64
<b>Gráfico 4.3</b> - Determinação do factor <b>z</b> de <i>S. enteritidis</i>	64
<b>Gráfico 4.4</b> - Valor do factor <b>z</b> para a inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i>	65
<b>Gráfico 5.1</b> - Curvas de inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> submetida a 200 MPa durante 5 minutos	66
<b>Gráfico 5.2</b> - Curvas de inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> submetida a 200 MPa durante 15 minutos	66
<b>Gráfico 5.3</b> - Curvas de inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> submetida a 200 MPa durante 30 minutos	67
<b>Gráfico 5.4</b> - Comparação do factor <b>D</b> de <i>S. enteritidis</i> a 52°C, antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos	69
<b>Gráfico 5.5</b> - Comparação do factor <b>D</b> de <i>S. enteritidis</i> a 54°C, antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos	69
<b>Gráfico 5.6</b> - Comparação do factor <b>D</b> de <i>S. enteritidis</i> a 56°C, antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos	69
<b>Gráfico 5.7</b> - Determinação do factor <b>z</b> de <i>S. enteritidis</i> , antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos	71
<b>Gráfico 6.1</b> - Curvas de inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> submetida a 200 MPa (5 minutos) e conservada 7 dias a 4°C	72
<b>Gráfico 6.2</b> - Curvas de inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> submetida a 200 MPa (15 minutos) e conservada 7 dias a 4°C	73
<b>Gráfico 6.3</b> - Curvas de inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> submetida a 200 MPa (30 minutos) e conservada 7 dias a 4°C	73
<b>Gráfico 6.4</b> - Comparação do factor <b>D</b> de <i>S. enteritidis</i> a 52°C, com e sem tratamentos de 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos	75
<b>Gráfico 6.5</b> - Comparação do factor <b>D</b> de <i>S. enteritidis</i> a 54°C, com e sem tratamentos de 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos	75
<b>Gráfico 6.6</b> - Comparação do factor <b>D</b> de <i>S. enteritidis</i> a 56°C, com e sem tratamentos de 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos	75
<b>Gráfico 6.7</b> - Determinação do factor <b>z</b> de <i>S. enteritidis</i> , antes e 7 dias após tratamentos de 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos	76

<b>Gráfico 8.1</b> – Curvas de inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> em OLI	80
<b>Gráfico 9.1</b> – Curvas de inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> em OLI submetida a 200 MPa durante 15 minutos	81
<b>Gráfico 9.2</b> – Curvas de inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> em OLI submetida a 200 MPa durante 30 minutos	81
<b>Gráfico 9.3</b> – Curvas de inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> em OLI e dos controlos apresentados na Tabela 9.1	82
<b>Gráfico 9.4</b> - Comparação do factor <b><i>D</i></b> de <i>S. enteritidis</i> em OLI a 50°C, antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 15 e 30 minutos	83
<b>Gráfico 9.5</b> - Comparação do factor <b><i>D</i></b> de <i>S. enteritidis</i> em OLI a 52°C, antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 15 e 30 minutos	83
<b>Gráfico 9.6</b> - Comparação do factor <b><i>D</i></b> de <i>S. enteritidis</i> em OLI a 54°C, antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 15 e 30 minutos	83
<b>Gráfico 9.7</b> - Comparação do factor <b><i>D</i></b> de <i>S. enteritidis</i> em OLI a 56°C, antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 15 e 30 minutos	84
<b>Gráfico 10.1</b> – Curvas de inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> em OLI com diferentes valores de $N_0$	87
<b>Gráfico 10.2</b> - Comparação do factor <b><i>D</i></b> de <i>S. enteritidis</i> em OLI a 52°C, com diferentes valores de $N_0$	87
<b>Gráfico 10.3</b> - Comparação do factor <b><i>D</i></b> de <i>S. enteritidis</i> em OLI a 54°C, com diferentes valores de $N_0$	87

## Índice de Tabelas

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 3.1</b> - Pressão usada na pasteurização de alimentos em várias unidades	16
<b>Tabela 8.1.1</b> - Composição média do ovo de galinha	28
<b>Tabela 8.1.2</b> - Composição proteica do albúmen	29
<b>Tabela 8.1.3</b> - Actividade antimicrobiana das proteínas do albúmen	30
<b>Tabela 8.4.1</b> - Condições de pasteurização para ovo líquido	34

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 7.2.1</b> - Tratamentos de Alta Pressão a 200 MPa	51
<b>Tabela 9.4.1</b> - Tratamentos de Alta Pressão a 200 MPa (OLI)	54

### CAPÍTULO IV

<b>Tabela 4.1</b> - Inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> (Série A)	62
<b>Tabela 4.2</b> - Inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> (Série B)	63
<b>Tabela 4.3</b> - Inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> (combinação das duas Séries)	65
<b>Tabela 5.1</b> - Inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> submetida a 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos	67
<b>Tabela 5.2</b> - Valor relativo (%) do factor <b>D</b> de <i>S. enteritidis</i> , após tratamentos de 200 MPa, comparado com o valor sem pressurização	68
<b>Tabela 6.1</b> - Inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> submetida a 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos e conservada 7 dias a 4°C	74
<b>Tabela 7.1</b> - Tratamento de Alta Pressão a 300 MPa	77
<b>Tabela 8.1</b> - Inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> em OLI	79
<b>Tabela 9.1</b> - Inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> em OLI, submetida a 200 MPa, durante 15 e 30 minutos	82
<b>Tabela 10.1</b> - Inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> em OLI, com diferentes valores de $N_0$	86
<b>Tabela 10.2</b> - Inactivação térmica de <i>S. enteritidis</i> em OLI, a partir valores de $N_0$ semelhantes	89

## **Índice de Figuras**

### **CAPÍTULO I**

**Figura 8.1.1** - Estrutura do ovo de galinha 28

**Figura 8.1.2** - Fotografia de microscopia electrónica da casca do  
ovo de galinha 28

### **CAPÍTULO III**

**Figura 7.2.1** – Prensa hidrostática utilizada no estudo (Departamento de  
Cerâmica e do Vidro da Universidade de Aveiro) 51

## Lista de Abreviaturas

<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>AP</b>	Alta Pressão
<b>atm</b>	atmosfera
<b>ATPase</b>	adenosina trifosfatase
<b>a<sub>w</sub></b>	actividade da água
<b>CDC</b>	<i>Center for Disease Control</i>
<b>cm</b>	centímetro (10 <sup>-2</sup> do metro)
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>GPa</b>	giga Pascal
<b>HACCP</b>	<i>Hazard Analysis of Critical Control Points</i>
<b>IC</b>	Intervalos de Confiança
<b>i.e.</b>	isto é
<b>kg</b>	kilograma
<b>Ln</b>	logaritmo de base natural
<b>Log</b>	logaritmo de base 10
<b>MPa</b>	mega Pascal
<b>ml</b>	mililitro (10 <sup>-3</sup> do litro)
<b>n</b>	número de observações
<b>nm</b>	nanómetro (10 <sup>-9</sup> do metro)
<b>OLI</b>	Ovo Líquido Inteiro
<b>pH</b>	valor do pH (simétrico do logaritmo decimal da concentração de iões de hidrogénio numa solução)
<b>p.e.</b>	por exemplo
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>r<sup>2</sup></b>	coeficiente de correlação linear
<b>Séc.</b>	Século
<b>T<sub>0</sub></b>	tempo zero de tratamento
<b>ufc</b>	unidade formadora de colónias
<b>USDA</b>	<i>United States Department of Agriculture</i>
<b>UV</b>	ultra-violeta

<b>μl</b>	microlitro ( $10^{-6}$ do litro)
<b>μm</b>	micrómetro ( $10^{-6}$ do metro)
<b>°C</b>	graus Celsius
<b>%</b>	percentagem
<b>(')</b>	minutos
<b>('')</b>	segundos

## **I- INTRODUÇÃO**

### **1. O CONSUMIDOR FACE AOS ALIMENTOS**

A actual tendência do consumidor moderno para preferir alimentos minimamente processados, mais frescos, mais saudáveis por intermédio de menores teores de sal, açúcar e gordura, mais convenientes de utilizar, mais seguros, de maior qualidade quanto a sabor, textura e aparência, e mais naturais por ausência de aditivos [1-3], tem enormes implicações relativamente ao modo como são encarados os métodos tradicionais de processamento, assim como comporta grandes desafios à indústria alimentar que pretenda compatibilizar esses requisitos com um nível elevado de segurança alimentar [4].

Gould [3] refere que o desejo do consumidor por alimentos minimamente processados tem encorajado o desenvolvimento de novos métodos para a inactivação de microrganismos em alimentos. Enquanto que a eficácia de muitos desses métodos foi há muito demonstrada, os avanços tecnológicos só agora começam a tornar possível a sua exploração comercial aplicada à preservação de alimentos [5,6].

### **2. NOVAS TECNOLOGIAS DE CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS**

Novos processos com reduzida aplicação de calor, ou mesmo atérmicos, aplicados a alimentos, de que são exemplos a Alta Pressão (AP), Campos Eléctricos Pulsados, Radiação Ionizante ou Ultrasonicação, têm recebido recentemente atenção considerável, pela sua capacidade potencial de inactivar microrganismos à temperatura ambiente ou a temperaturas subletais, evitando simultaneamente os efeitos deletérios que o calor tem sobre o sabor, cor e valor nutricional dos alimentos [1,7-10].

Dos processos acima referidos, apenas a AP e a Radiação Ionizante são hoje usados a nível industrial. Contudo, o uso de Radiação Ionizante tem encontrado alguns problemas de segurança, estando a sua utilização limitada a um grupo muito restrito de alimentos, particularmente na União Europeia [11]. Adicionalmente, o consumidor tem uma percepção positiva relativamente aos alimentos processados por AP, ao contrário do que acontece com aqueles que são irradiados.

A resistência de esporos ou a existência de subpopulações microbianas extremamente resistentes, adicionado ao elevado custo ou dispêndio de energia de algumas destas tecnologias emergentes, constituem factores limitantes à sua eficácia e expansão de utilização no processamento alimentar [5,7,12-14].

Com os elevados níveis de intensidade de tratamento necessários para inactivar um número significativo de microrganismos, certos processos atérmicos também podem afectar as propriedades sensoriais dos alimentos. Em particular, o processamento por AP pode alterar a estrutura de proteínas e polissacáridos, causando mudanças na textura, aparência física e funcionalidade de alimentos [5,15,16]; por outro lado, algumas enzimas relacionadas com a Qualidade dos alimentos podem ser inactivadas por AP [17].

### 3. PROCESSAMENTO POR ALTA PRESSÃO EM ALIMENTOS

O uso de AP em alimentos, líquidos ou sólidos, com ou sem embalagem, implica actualmente a aplicação de pressões entre 100 a 800 MPa. Para se ter uma ideia dos valores de pressão em causa, 100 MPa equivale à pressão a 10000 metros de profundidade no oceano, e 360 GPa é a pressão no centro da Terra; a temperatura de processamento pode ser ambiente (para minimizar os efeitos do aquecimento adiabático de 3°C por 100 MPa), negativa ou acima de 100°C [6].

Actualmente, a nível industrial, a AP é aplicada à temperatura ambiente, por facilidade de processamento e menores custos associados.

A designação "Alta Pressão" advém da elevada magnitude de pressões que são utilizadas; p.e., para pasteurizar sumos de fruta a pressão utilizada é de cerca de 450 MPa (**Tabela 3.1**), o que corresponde a 4589 kg/cm<sup>2</sup> e a 4441 atm, constituindo assim pressões bastantes elevadas.

**Tabela 3.1 – Pressão usada na pasteurização de alimentos em várias unidades**

MPa	kg/cm <sup>2</sup>	atm
100	1020	987
450	4589	4441
1000	10197	9869



O recurso ao processamento por AP como tecnologia atérmica para inactivar microrganismos não é um conceito novo, tendo sido iniciado por Roger em 1895. No entanto, no campo da ciência e tecnologia alimentar o trabalho considerado mais importante é o de Hite, em 1899, que mostrou que o tempo de prateleira do leite poderia ser aumentado em 4 dias, após um tratamento de pressão a 600 MPa durante 1 hora à temperatura ambiente [7,18,19].

Enquanto que o processamento por AP tem vindo a ser investigado e utilizado desde há muito em diversos ramos da engenharia (como a cerâmica), o seu emprego no sector alimentar apenas se dá a partir do início dos anos 70 do Séc. XX, fruto da pressão e evolução das expectativas do consumidor face à saúde pelos alimentos, dos avanços do conhecimento nas ciências da vida, e da redução de custo dos equipamentos.

Apesar da pesquisa inicial em Alta Pressão em alimentos ter sido constituída principalmente por um processo qualitativo de tentativa e erro, é caracterizada actualmente por uma aproximação mais sistematizada, na qual é dada fundamental atenção aos aspectos cinéticos e à especificidade de cada produto alimentar [17].

A AP é usada a nível industrial desde 1990, altura em que os primeiros alimentos pasteurizados começaram a ser comercializados no Japão [13,18]. Desde então, outros produtos têm sido introduzidos no mercado em outros países, destacando-se os sumos de fruta, as ostras, o guacamole (puré de pêra abacate), geleias, patês e compotas.

Com o conhecimento e experiência adquiridos, é hoje claro que a pasteurização de alimentos por AP garante a necessária segurança microbiológica e permite obter alimentos quase indistinguíveis dos alimentos originais não processados. Cumulativamente, não existem actualmente dados que indiquem eventuais efeitos de âmbito toxicológico que possam colocar em causa a segurança na utilização de AP para pasteurizar alimentos [17]. Todos estes factores conjugados, levam a que, quer no meio académico, quer no meio industrial, se considere hoje a AP como a alternativa atérmica para processamento de alimentos com maior potencial de desenvolvimento nos próximos anos.

O processamento por AP aplicado a alimentos apresenta várias vantagens sobre métodos térmicos convencionais, incluindo a ausência de aditivos e a possibilidade de operar a baixa temperatura ou à temperatura ambiente, pelo que o alimento retém melhor as suas características sensoriais (frescura, sabor, textura e cor) e nutricionais (ausência de perdas de vitamina B1 e B6, perdas mínimas de vitamina C) [20,21]. Como já foi anteriormente referido, para além da destruição de microrganismos, a AP pode inactivar enzimas e promover mudanças desejáveis na gelatinização e gelificação de amidos [7,22,23].

Muito poucos estudos existem ainda relativos ao processamento por Alta Pressão a temperaturas abaixo de 0°C [23], mas Hashizume *et al.* [128] verificaram que o mesmo grau de inactivação de *Saccharomyces cerevisiae* pôde ser atingido com menores intensidades de processamento por AP, desde que aplicado a temperaturas negativas.

No entanto, quando se associa a AP à temperatura de processamento, devem ser consideradas as transferências de calor entre amostra, meio e câmara de pressão, que poderão resultar em gradientes de temperatura no alimento e consequentemente em processamento não homogéneo. A falta de dados ou de controlo relativamente a este parâmetro pode levar a conclusões erradas e prejudicar a reprodutibilidade de diferentes estudos [24].

É ainda de assinalar o facto de as embalagens de alimentos processados por AP necessitarem de acomodar a variação de volume causada pela compressão (cerca de 15% para 600 MPa), e de regressar ao seu volume original sem perder quer o seu selo quer as suas propriedades de barreira [18].

#### 4. MECANISMOS DE ACÇÃO DA ALTA PRESSÃO EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

Como regra geral (Princípio de Le Chatelier), a AP favorece as reacções que originem uma diminuição global de volume do sistema, sendo que as reacções envolvendo aumento de volume são geralmente inibidas ou reduzidas pela aplicação de AP [18,25]. Dito de outra forma, qualquer fenómeno em equilíbrio (reacção química, transição de fase, mudança na configuração molecular) acompanhado de uma diminuição de volume será favorecido pela AP [7]. As alterações de volume são devidas à compactação das moléculas de água em redor de proteínas, ácidos nucleicos e iões em geral [25]. Os componentes de baixo peso molecular, sem estrutura secundária,

dos alimentos (alguns responsáveis por características nutricionais e sensoriais) não são afectados [7].

Contudo, devido à complexidade dos alimentos e à possibilidade de mudanças e reacções que podem ocorrer sob AP, as previsões sobre os efeitos deste tipo de processamento são difíceis, tal como as generalizações acerca de qualquer tipo de alimento [4].

A AP afecta apenas ligações não-covalentes, deixando as covalentes intactas e, consequentemente, induz alterações na estrutura secundária e terciária das proteínas [26]. De um modo geral, pressões acima de 300 MPa causam desnaturação proteica irreversível à temperatura ambiente, enquanto que abaixo desse valor as alterações são reversíveis [13,15,17].

A resposta das proteínas à pressão pode variar bastante, pois as interacções hidrofóbicas comportam-se de forma peculiar sob AP: até 100 MPa, as interacções hidrofóbicas tendem a resultar em aumento de volume, mas para lá deste valor, a pressão tende a estabilizar estas ligações, ocorrendo uma diminuição de volume [18].

Outra regra que governa o processamento por AP é o Princípio Isostático - a transmissão da pressão é uniforme e instantânea, tornando o efeito do processamento independente do tamanho, geometria ou composição do alimento ou da embalagem [7,21].

É geralmente assumido que os locais primários onde ocorrem os danos em microrganismos provocados pela AP são a membrana e proteínas responsáveis pela replicação, integridade e metabolismo [26,20, 27].

A AP não altera ligações covalentes [7,13], mas altera principalmente ligações de hidrogénio, iónicas e hidrofóbicas responsáveis por manterem as proteínas na sua forma biologicamente activa [22,28].

Não obstante, o processamento por AP deve ser encarado como capaz de afectar, não uma função específica, mas uma conjugação de processos que ocorrem na estrutura celular.

Para além dos danos na membrana de microrganismos submetidos a AP, Cheftel [29] refere uma diminuição do pH devido à compactação das moléculas de água em redor de grupos carregados, com a resultante redução do volume total do sistema.

Smelt [30] refere a possibilidade dos microrganismos morrerem por acidificação interna, devido à perda de actividade dos mecanismos responsáveis pela manutenção do pH intracelular, quer pela desnaturação enzimática, quer pela sua deslocação na membrana.

Knorr [31,26] verificou uma reduzida actividade da ATPase de Na/K, durante e após o processamento por AP, o que pode estar relacionado com uma diminuição na fluidez lipídica da camada dupla da membrana.

O processamento por AP induz alterações morfológicas nas células microbianas, podendo ocorrer separação da parede celular e perda de homogeneidade da camada intermédia entre a parede celular e a membrana citoplasmática; Hoover *et al.* [32] referem a possibilidade da AP afectar os sistemas de reacções, quer reduzindo o espaço molecular disponível, quer aumentando as interacções intercadeias. Deste modo, as reacções envolvendo a formação de ligações de hidrogénio são favorecidas, pois daí resulta uma diminuição de volume. Contudo, Masson [33] reportou que as ligações de hidrogénio não são sensíveis à AP.

Segundo Palou *et al.* [4] e Ngarize *et al.* [16], o alvo principal da AP são as ligações electrostáticas e hidrofóbicas em moléculas proteicas, causando desprotonação, com formação de grupos carregados, e quebra de ligações hidrofóbicas, resultando em alterações estruturais e conformacionais das proteínas, acompanhadas por grandes mudanças de hidratação, a principal fonte de diminuição de volume associada à dissociação e desnaturação de proteínas.

A avaliação da eficácia das diversas variáveis na morte celular causada por AP inclui a intensidade da pressão, tempo necessário para a atingir, duração da pressurização, temperatura de processamento, tipos de microrganismos, fase de crescimento celular, meio de suspensão e presença de substâncias antimicrobianas. De uma forma genérica, a destruição celular aumenta com a intensidade da pressão e tempo de pressurização, com a temperatura, em meios de suspensão com baixo teor sólido, e na presença de substâncias antimicrobianas [26,20,34-36].

A aplicação de processamento por AP por pulsos de pressão (AP dinâmica), por oposição à sua aplicação de forma contínua, é igualmente referida como uma variável que pode interferir favoravelmente na velocidade de morte celular [37-39].

Em adição, o papel de uma rápida descompressão tem sido apontado como um factor a ter em conta no futuro da investigação, pela possibilidade de provocar cavitações em bactérias e esporos que resultem em disrupção física e morte [18].

Os efeitos da  $a_w$  são difíceis de avaliar, dado que, por um lado, a redução da  $a_w$  protege os organismos dos efeitos da AP mas, por outro lado, também dificulta o posterior trabalho de reparação celular à pressão atmosférica normal [18,40].

Normalmente, as bactérias de Gram-positivo são mais resistentes ao *stress* ambiental que as de Gram-negativo, o que se aplica também ao processamento por AP, pelo que a destruição de bactérias de Gram-positivo necessita de pressão e/ou tempos de pressurização mais elevados; as bactérias em fase exponencial de crescimento são também mais sensíveis aos efeitos da AP que na fase estacionária [18,34,35].

Alguns exemplos com maior baroresistência são o *Clostridium botulinum* e o *Bacillus cereus* (microrganismos esporulados) e a *Listeria monocytogenes* e o *Staphylococcus aureus* (não esporulados) [4,18].

## 5. O PROCESSAMENTO COMBINADO ENVOLVENDO ALTA PRESSÃO

A estabilidade e a segurança microbiológica de muitos alimentos baseiam-se numa combinação de vários factores de preservação – barreiras (*hurdles*, em Inglês), cujos efeitos, aditivos ou sinérgicos, os microrganismos presentes no alimento não são capazes de superar. Este efeito foi primeiramente descrito por Leistner, em 1978, ilustrando o facto sobejamente conhecido que as complexas interacções de factores como, p.e., a temperatura, a  $a_w$ , o pH, ou o potencial redox, são determinantes para a estabilidade microbiológica de alimentos. Da compreensão deste efeito derivou a *tecnologia de barreiras*, com vista a permitir melhorias na segurança e Qualidade de alimentos, usando, deliberadamente, combinações inteligentes de barreiras antimicrobianas [41].

Embora menos frequentemente, este conceito é também referido como “preservação de alimentos por métodos combinados”, “processos combinados”, “preservação por combinação”, ou “técnicas de combinação”. As vantagens deste tipo de aproximação à preservação de alimentos traduzem-se na produção de alimentos mais frescos e seguros, e com custos de produção e armazenamento mais eficientes [41].

Uma limitação ao sucesso do processamento combinado em alimentos pode ser potencialmente constituída pelas reacções microbianas às condições de *stress* impostas; algumas bactérias tornam-se mais resistentes ou até mais virulentas em ambiente hostil, quer por indução da síntese de proteínas de *stress*, quer por mecanismos de protecção cruzada [1,42].

Por outro lado, a activação de genes para a síntese destas proteínas será mais difícil se diferentes tipos de *stress* forem recebidos pela célula em simultâneo e em diferentes alvos (membrana celular, ADN, sistemas enzimáticos), requerendo uma síntese aumentada deste tipo de proteínas de efeitos protectores, o que por sua vez pode conduzir à exaustão metabólica [41].

### 5.1- Alta Pressão e Dióxido de Carbono

Embora a intensidades muito baixas de pressão (inferior a 15 MPa) para os parâmetros habituais do processamento por AP, a eficácia deste tipo de processamento é apontada como muito elevada devido aos efeitos antimicrobianos do CO<sub>2</sub>; o mecanismo letal sugerido consiste num pH intracelular diminuído causado pelo aumento dos níveis elevados de CO<sub>2</sub> dentro da célula, e não por ruptura física da membrana ou parede celular devido à pressão do CO<sub>2</sub> [18,43].

### 5.2- Alta Pressão e pH

A pressurização estreita o leque de pH para o crescimento microbiano [6], tendo um particular efeito inibidor da ATPase da membrana, enzima importante na fisiologia ácido-base das células [5]; o processamento por AP pode baixar o pH até 0,2 unidades/100 MPa, o que, por sua vez, pode tornar os microrganismos ainda mais susceptíveis aos seus efeitos [18].

### 5.3- Alta Pressão e Agentes Antimicrobianos

Verifica-se, em processamento por AP, que a presença de substâncias como, entre outras, a nisina, a lisozima, ou a lactoferrina, gera um efeito independente e significativo no aumento nos danos provocados em bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo em leite desnatado, soro e tampão [2,22,44].

Os processamentos com este tipo de combinação consideram a permeabilização da membrana como a causa primária de danos provocados pela AP na célula vegetativa (devido a mudanças irreversíveis na estrutura de macromoléculas como as proteínas, e favorecida pela compressão e alterações de fase da camada dupla fosfolipídica, com diminuição de espaço entre as cadeias hidrocarbonadas), sugerindo essa permeabilização como factor facilitador da acção de agentes antimicrobianos [5,7,26,45]; a eficácia do efeito barreira de centenas de compostos antimicrobianos de ervas e especiarias, existentes em sistemas de ocorrência natural, tem sido igualmente objecto de estudo [3,46].

#### 5.4- Alta Pressão e Temperatura

A combinação de dois ou mais processos atérmicos (AP e Irradiação / Campos Eléctricos Pulsados / Ultrasonicação) pode aumentar o grau de inactivação microbiana e permitir o uso de menores intensidades individuais de processamento [2].

Adicionalmente, a combinação de processos atérmicos (p.e., AP) com processos convencionais de preservação (temperatura) aumenta a taxa de inactivação de enzimas microbianas, para que igualmente menores intensidades individuais de processamento possam ser usadas [18]; a exaustão metabólica é acelerada por diferentes componentes da célula serem afectados em simultâneo, dado o aumento das necessidades energéticas para manter a homeostase interna debaixo de diferentes condições de *stress* subletal [5,41].

Uma possibilidade diferente de combinação entre a AP e a temperatura é a sua aplicação sequencial, em vez de simultânea, i.e., pretende-se neste tipo de processamento que a AP não destrua os microrganismos, mas sim que modifique a sua resistência a uma subsequente aplicação de calor [1,25].

### 6. RELEVÂNCIA DE *SALMONELLA* spp ENQUANTO PATOGENICO DE ORIGEM ALIMENTAR

A designação *Salmonella* spp significa "*Salmonella species*"; no entanto, de entre a literatura científica publicada, verifica-se bastante variabilidade relativamente à norma de subdivisão do género *Salmonella*. Este último pode ser subdividido em três espécies (*S. typhi*, 1 serótipo; *S. choleraesuis*, 1 serótipo; *S. enteritidis*, cerca de 1800

serótipos); outros autores classificam cada serótipo conhecido como uma espécie distinta (p.e., a designação *S. dublin* equivalerá a uma espécie, enquanto que no primeiro caso, a designação será *S. enteritidis* serótipo *dublin*); finalmente, e baseado no relacionamento determinado por análise de ADN, outros autores consideram a *S. typhi* não como uma espécie distinta, mas como um serótipo de *S. enterica*. Todos estes sistemas de classificação são correntes [47,48]. Neste trabalho, foi seguido um critério único, que apresenta a *S. enteritidis* como uma espécie distinta, podendo esta ser subdividida por serótipos, consoante a especificidade antigénica [49,129].

A salmonelose é uma infecção gastrointestinal causada pelo conjunto das bactérias do género *Salmonella*, sendo os agentes infecciosos mais comuns a *S. typhimurium*, a *S. typhi*, e a *S. enteritidis* [50].

Esta bactéria invade as microvilosidades intestinais e provoca a degeneração do epitélio gastrointestinal por produção de enterotoxina e citotoxinas [51-53]; o período de incubação é relativamente curto (8-72 horas após ingestão), e provoca um quadro clínico que, consoante o agente implicado, inclui diarreia, dor abdominal, febre, arrepios, dor de cabeça, náusea, vômito [51,54], por um período de 4 a 7 dias [55,56].

Cerca de 2% das pessoas afectadas podem desenvolver mais tarde dores articulares e artrite [57]. Idosos, crianças, imunocomprometidos, e situações de baixa acidez gástrica, flora intestinal alterada, ou peristaltismo intestinal reduzido, podem evoluir para um quadro mais severo, espalhando-se a infecção dos intestinos para o sangue, e daí para outras partes do corpo podendo causar morte [55,56,58].

Consoante as diferenças entre os serótipos envolvidos, de acordo com a idade e estado de saúde da pessoa afectada, e com o alimento em causa, a dose infecciosa pode variar de 15-20 até 10<sup>5</sup> células [59-61].

Nos Estados Unidos da América (EUA), o *Center for Disease Control (CDC)* estima em 76 milhões os casos anuais de doença por contaminação de origem alimentar, dos quais resultam 325 000 hospitalizações e 5000 mortes [60]. A parcela provocada por salmonelose está estimada entre 2 a 4 milhões [59,62], e associadas a 1000 mortes [56]. A *S. enteritidis* apresenta, nos EUA, 3,6% de taxa de mortalidade em surtos em ambiente hospitalar/apoios domiciliários [59].

*S. typhimurium* e *S. enteritidis* são apontadas como responsáveis por cerca de metade de todas as infecções humanas [50,54], e por 16 465 casos no Reino Unido, só em 2001 [63].



No Brasil (Estado de São Paulo), embora não sendo a salmonelose uma doença de notificação clínica obrigatória, a *S. enteritidis* é considerada o agente infeccioso mais frequentemente associado a doenças de origem alimentar [64].

Em Espanha, 30% de 4596 surtos de intoxicações alimentares, entre 1976 e 1989, tiveram como agente infeccioso a *S. enteritidis* [65].

Em Portugal, não está ainda implementado um sistema de vigilância que permita avaliar e analisar com perfeito rigor as toxinfecções alimentares registadas em território nacional. No entanto, o Instituto Nacional de Saúde apresentou dados relativos sobre surtos identificados pelo Instituto em Lisboa, de 1992 a 2000, consistindo em 222 surtos, 38 casos isolados, 4204 pessoas afectadas, 708 hospitalizadas e 1 morto confirmado [66]. Foram também publicados, em 2005, pela Direcção Geral da Saúde [67] os dados nacionais relativos às doenças de declaração obrigatória, onde se inserem as salmoneloses: entre 2000 e 2004, verificaram-se em Portugal 563 notificações de febre tifóide e paratifóide, e 2305 notificações de outras salmoneloses.

Uma fonte adicional de preocupação consiste no facto de, acompanhando a tendência actual que se verifica noutros campos da Microbiologia devido a más práticas clínicas (como as doenças infecto-contagiosas), têm surgido estirpes de *Salmonella* multirresistentes à antibioterapia [68], indiciando uma selecção inadvertida promovida pelos produtores avícolas, com prejuízos evidentes a prazo para a Saúde Pública.

## 7. CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE

A *S. enteritidis* é uma bactéria de Gram-negativo da família das Enterobacteriaceae, com mais de 1800 serótipos conhecidos, todos patogénicos para o Homem e frequentemente para os animais, cada um dos quais caracterizado por uma combinação particular de antigénios *O* (somático) e *H* (flagelar); possui forma de bastonete, e é móvel por flagelos (tipo peritrico), aeróbia-anaeróbia facultativa, e não formadora de esporos; oxidase-negativo,  $\beta$ -galactosidase-negativo, urease-negativo e manitol-positivo [52,53,69,70].

Ocorre de forma corrente no tracto digestivo de animais, particularmente em aves de aviário e gado suíno. Como organismo ubiquitário, as fontes no ambiente incluem água, solo, insectos, superfícies fabris, superfícies de cozinha, fezes de animais, carne

crua, frango cru e pescado cru [59,68]. A infecção humana pode ocorrer por ingestão de água ou alimentos contaminados, mas também por pessoa infectada pela via oral-fecal através de maus hábitos de higiene, ou ainda por contacto com animais domésticos [57].

Considerada sensível à temperatura, desenvolve-se, consoante as referências bibliográficas e o serótipo em questão, entre os 4,4-46°C [66], 8-45°C [58], 2-45,6°C [71], 2-54°C [66], 5-45/47°C [70], com temperatura óptima entre 35-37°C [54,66]; é destruída pelo calor a 65°C durante 12 a 15 minutos [66].

O pH de crescimento situa-se entre 4,0-8,0 [58], 4,9-8,0 [71], 4,5-9,5 [57], 4,5-9 [69], com valores óptimos entre 6,5-7,5 [54,70], 6,6-8,2 [66].

Não apresenta crescimento a valores de  $a_w$  inferiores a 0,93, e é inibida pela presença de NaCl entre 3 e 4% [57].

## 8. A SALMONELOSE ASSOCIADA AO CONSUMO DE OVOS E OVOPRODUTOS

O género *Salmonella* constitui um grupo de microrganismos patogénicos de enorme importância numa grande variedade de alimentos, especialmente de aviário [20,72]. Os ovos e ovoprodutos têm sido implicados num grande número de toxinfecções alimentares, sendo a *S. enteritidis* o microrganismo mais frequentemente associado a esses incidentes [38,64,73]. Como exemplo, foram registadas 14088 salmoneloses em 2000, somente na Bélgica, representando a *S. enteritidis* 67% dos casos, todos associados ao consumo de ovos [61,74].

Segundo a Organização Mundial de Saúde, durante os anos 90 do Séc.XX, a *S. enteritidis* causou aproximadamente 80% das salmoneloses reportadas a nível Europeu, 70% das quais a partir do consumo de ovos e ovoprodutos [75], constituindo, deste modo, um importante problema de saúde pública no mundo industrializado [55,57].

### 8.1- Composição e Estrutura do Ovo

Os ovos de aves, principalmente os de galinha (*Gallus domesticas*), têm sido um alimento para a espécie humana desde a Pré-história, e um dos poucos utilizados em todo o mundo, apresentando menor expressão mundial (mesmo na Ásia) o consumo de ovos de outras aves [76,77]. O próprio termo "ovo", quando isolado, aplica-se por

defeito ao ovo de galinha, cuja produção mundial se situou, em 1990, em 552 919 milhões de unidades, segundo o *United States Department of Agriculture (USDA)* [78].

O ovo é um alimento de interesse nutricional para todas as idades, providenciando naturalmente proteínas de alto valor biológico, ácido linoleico, vitaminas lipossolúveis, ferro, fósforo e outros minerais. O seu contributo para um padrão alimentar saudável insere-se a par de outros alimentos como o pescado e produtos cárneos.

Adicionalmente, o ovo possui também outras características altamente vantajosas, como o seu baixo custo, e fácil preparação e digestão. Uma mais-valia suplementar é o facto de o ovo ser um alimento de muito fácil mastigação, o que o posiciona facilmente na composição de dietas brandas ou nos hábitos alimentares de quem possui dentição reduzida ou diminuída.

As suas excepcionais capacidades funcionais contribuem para a sua milenar inclusão em inúmeras receitas, quer para espessamento ou emulsificação de misturas, quer pela capacidade de ligação dos vários ingredientes. As propriedades quase únicas das suas proteínas estão igualmente na base da sua extensa utilização numa gama alargada de produtos alimentares [79].

Em anos mais recentes, os avanços do conhecimento tornaram possível a modificação intencional das características nutricionais do ovo, sendo uma das mais interessantes o seu enriquecimento com ácidos gordos polinsaturados da série Omega 3 (*W3-PUFA*), incorporados nos fosfolípidos da gema por modificação dietética nas poedeiras.

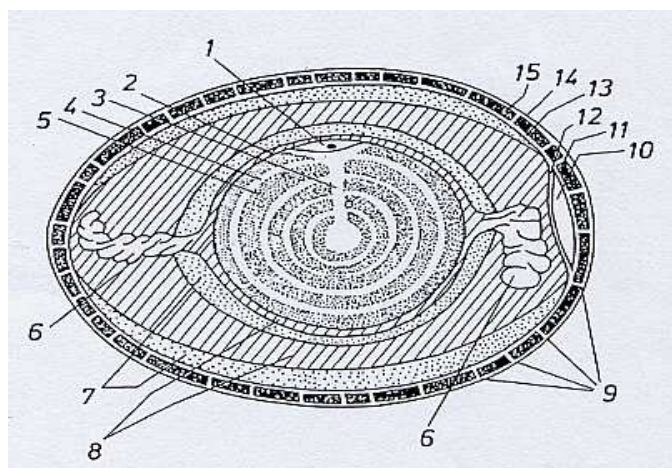
Na natureza, o ovo é uma geração seguinte encapsulada que, em determinadas condições, e se não for consumido antes, se transformará numa nova ave. Exceptuando as trocas gasosas, este evento decorre exclusivamente da utilização e transformação dos seus componentes internos.

Estruturalmente, o ovo consiste basicamente em três partes distintas: casca, clara e gema, cada uma das quais com características e funções muito específicas. A **Tabela 8.1.1** e as **Figuras 8.1.1** e **8.1.2** descrevem sumariamente a composição e a estrutura do ovo.

**Tabela 8.1.1 - Composição média do ovo de galinha**

Fracção	% Peso Total	Matéria seca (%)	Proteínas (%)	Gorduras (%)	Hidratos de Carbono (%)	Minerais (%)
Casca	10,3	98,4	3,3	-	-	95,1
Clara	56,9	12,1	10,6	0,03	0,9	0,6
Gema	32,8	51,3	16,6	32,6	1,0	1,1

Adaptado de Belitz, Grosch e Schieberle [76]

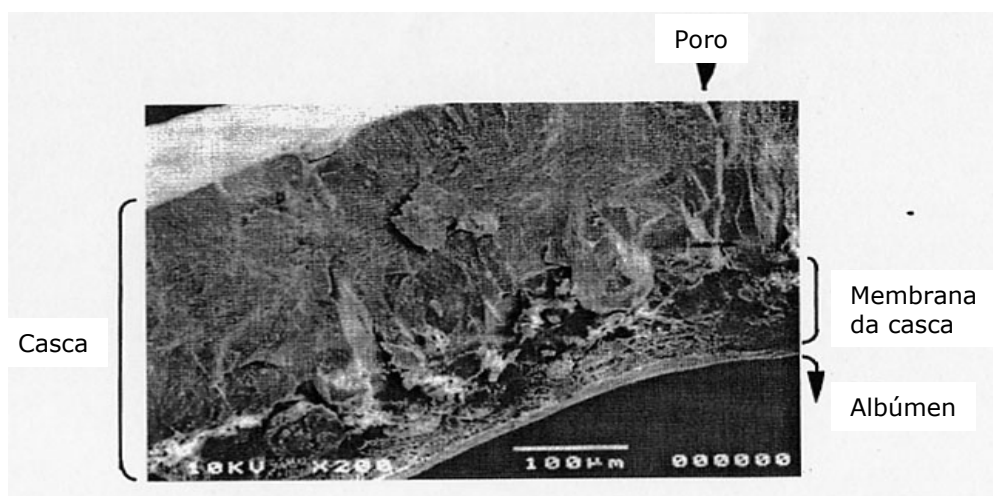


**Figura 8.1.1 - Estrutura do ovo de galinha.**

Gema: 1-disco embrionário, 2-membrana, 3-látebra, 4-camadas amarelo claro, 5-camadas amarelo escuro.

Clara: 6-calazas, 7-albúmen fino, 8-albúmen espesso.

Casca: 9-poros, 10-câmara de ar, 11-membrana, 12-membrana interior, 13-superfície da casca conexa à camada mamilar, 14-cutícula, 15-camada calcária esponjosa. (Adaptado de Belitz, Grosch e Schieberle [76])



**Figura 8.1.2 - Fotografia de microscopia eletrônica da casca do ovo de galinha**

(Adaptado de Okubo, Akachi e Hatta [77])

A casca (0,2-0,4 mm de espessura, de coloração variada) apresenta-se externamente revestida por uma fina camada mucilaginosa - a cutícula (10 µm de espessura), debaixo da qual uma matriz esponjosa de cristais de carbonato de cálcio é atravessada por 7000 a 17000 poros (10-30 µm de diâmetro) [76]; a cutícula sela parcialmente os poros, embora estes permaneçam permeáveis a trocas gasosas enquanto simultaneamente restringem a penetração de água e de microrganismos [76,77].

**Tabela 8.1.2 - Composição proteica do albúmen**

	% Proteínas totais
Ovalbumina	54
Ovotransferrina	12
Ovomucóide	11
Ovomucina	3,5
Ovoglobulina G2	4
Ovoglobulina G3	4
Lisozima	3,4
Ovomacroglobulina	0,5
Ovoglicoproteína	1
Ovoflavoproteína	0,8
Ovoinibidor	1,5
Cistatina (inibidor da ficina-papaína)	0,05
Avidina	0,5

Adaptado de Sugino, Nitoda e Juneja [80]

Para além das suas propriedades funcionais, tem sido descrita desde há muito a importante actividade biológica de várias proteínas do albúmen, designadamente antimicrobiana [61,76,80,81], conforme se apresenta na **Tabela 8.1.3**.

Uma das estruturas mais singulares do albúmen consiste na formação de duas calazas ancoradas em ambos os extremos do ovo, enroladas sobre si próprias em direcções opostas, de forma a manter a gema suspensa no centro do ovo [76,77].

A gema, envolta numa membrana vitelina, consiste fundamentalmente em camadas alternadas e concêntricas de material lipídico e lipoproteico emulsionado, morfológicamente estruturado com os componentes embrionários que gerarão a nova vida [76,77,80]. A sua cor amarelo-alaranjada é atribuída à presença de carotenóides solúveis na fracção lipídica das lipoproteínas [82]. Esta fracção do ovo também se caracteriza pela abundância relativa de fosvitina, uma proteína com grande capacidade quelante de iões metálicos, exercendo assim um efeito antimicrobiano [83].

**Tabela 8.1.3 - Actividade antimicrobiana das proteínas do albúmen**

	Actividade	Referência Bibliográfica
Lisozima	Hidrólise de ligações glicosídicas $\beta$ (1-4) no peptidoglicano da parede celular bacteriana	Geoffroy and Bailey (1975)
	Floculação de células bacterianas	Friedberger and Hoder (1932);
	Transglicosilação de tetrassacáridos da parede celular bacteriana em oligossacáridos	Chipman and Sharon (1969)
Ovotransferrina	Quelação de $\text{Fe}^{3+}$ , $\text{Cu}^{3+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Ni}^{2+}$	Tan and Woodworth (1969); Harris (1980)
Avidina	Ligação à biotina, tornando-a indisponível a bactérias que dela necessitem	Green (1975); Chignell, Starkweather and Sinha (1975)
Ovoflavoproteína	Ligação à riboflavina, tornando-a indisponível a bactérias que dela necessitem	Clagett (1971); Miller, Buss and Glagett (1981)
Ovomucóide	Inibição de tripsina Inibição de quimotripsina Inibição de proteinase fúngica	Feeney and Allison (1969); Liu, Menas and Feeney (1971) Zahnley (1980)
Cistatina	Inibição de ficina e papaína	Sem and Whitaker (1973) Segundo Board e Tranter [81]

Bourgeois *et al.* [70] referem para o pH da gema um valor de 6,3 e para o da clara um valor entre 7,6 e 7,9. Este valor de pH na clara pode aumentar até 9,5, à medida que aumenta o teor de  $\text{CO}_2$ , em virtude das trocas gasosas ocorridas pelos poros do ovo, e das características da selagem da casca [82,84]; Board *et al.* [81] e Messens *et al.* [74] consideram este valor como um factor antimicrobiano por si só, bem como um facilitador da quelação de minerais efectuada pela ovotransferrina.

Já o pH em ovo líquido inteiro é referido [84,85] com um valor entre 6,2 e 7,6 (igualmente em função do teor de  $\text{CO}_2$  na casca, aquando do momento da sua quebra), o que se encontra num intervalo óptimo para a multiplicação de *Salmonella spp.* Kobayashi *et al.* [86] também referem a existência de um padrão de multiplicação microbiana diferenciado (mais rápido) em ovo líquido inteiro e em gema, relativamente ao observado em clara.

## 8.2- Contaminação do Ovo por *S. enteritidis*

Segundo a Agência Portuguesa de Segurança Alimentar [66], ainda que o interior do ovo esteja, normalmente, isento de microrganismos, a casca pode contaminar-se facilmente por matérias fecais (durante o trajecto final do ovo através do intestino da galinha) ou por deficiências nas embalagens e manipulações, acrescentando que a abrasão da cutícula ou a porosidade da casca (quando húmida) podem permitir a passagem de microrganismos para o seu interior; as alterações provocadas pela maioria destes microrganismos são visíveis a olho nu, em fases avançadas de multiplicação, levando à eliminação desses ovos para consumo pelos controlos nos Centros de Inspeção e Classificação. Contudo, adverte a Agência [66], a contaminação interior por *S. enteritidis* não produz alterações visíveis como as provocadas pela flora corrente de alteração.

Adicionalmente, nos EUA, a *Food and Drug Administration (FDA)* e o *CDC* [55,59] alertam para o facto de, e ao contrário das salmoneloses relacionadas com o consumo de ovos em décadas passadas, a epidemiologia corrente se relacionar com o consumo de ovos classe A, intactos e desinfectados, i.e., a *S. enteritidis* tem a capacidade de infectar os ovários e oviductos de fêmeas de aparência saudável, contaminando os ovos *antes* das cascas estarem completamente formadas [74].

Apesar de patogénica para a espécie humana, esta bactéria não provoca mortalidade relevante nas galinhas, permitindo que aves infectadas mantenham a sua taxa normal de produção de ovos, transferindo-lhes a bactéria; contudo, segundo Kobayashi *et al.* [86], e ao contrário do que seria expectável, a taxa de infecção em ovos de galinhas portadoras é de apenas 1%, parecendo assim mais provável a contaminação ambiental após a postura, designadamente por fezes contendo *S. enteritidis*.

Por outro lado, e como já foi anteriormente referido, é justamente no ovo já formado que se apresentam as diversas barreiras físicas (p.e., estrutura da casca, viscosidade das proteínas do albúmen ou a posição das calazas) e bioquímicas (p.e., enzimas e anticorpos no albúmen e gema) à contaminação microbiana, e que impedem, em caso de infecção pós-postura por penetração da casca, uma rápida multiplicação do agente infeccioso, minimizando o número de células que alcançam a gema [86].

Face ao exposto, devem ser tidas em conta as duas vias de contaminação de ovos por *S. enteritidis* (horizontal – através da casca, e vertical – antes da formação do ovo),

dado existirem diversas variáveis em ambos os mecanismos [74], e ainda não ser certo qual o mecanismo de contaminação mais importante [61,87,88].

### 8.3- Estratégias de Intervenção

Em resposta ao aumento registado de doença provocada por *S. enteritidis* no consumo de ovos e ovoprodutos (e até porque, apenas nos EUA, os custos anuais com as salmoneloses - das despesas médicas à diminuição de rendimento, foram estimados, em 1995, entre 350 milhões a 1,5 biliões de dólares) [62], várias estratégias de intervenção têm sido propostas [75], entre as quais: melhoria das condições higio-sanitárias de aviários e de fábricas de ovoprodutos (a mais eficaz), educação dos consumidores sobre temperaturas de conservação, preferência pelo uso doméstico de ovo pasteurizado (esta de fraco sucesso), e vacinação das aves para *S. enteritidis* [89].

Com efeito, a infecção de *S. enteritidis* nos ovários de animais de aviário tem sido um motivo de preocupação nos anos mais recentes, designadamente no que se refere à melhoria da eficácia dos próprios métodos de detecção da infecção nas aves [90].

Na Austrália, onde não existem casos registados de *S. enteritidis* em lotes comerciais de aves, várias políticas de controlo ao nível da produção primária de ovos têm sido estabelecidas, particularmente a monitorização sistematizada dos níveis de *S. enteritidis* em ovo pré-pasteurização [72].

Paralelamente, também nas últimas décadas tem sido dado especial ênfase à criação de medidas de prevenção e de minimização de riscos associados ao consumo de alimentos de uma forma geral, dado que num mundo mais globalizado, com um sistema de produção alimentar centralizado, massificado e de distribuição em larga escala, também os seus problemas se espalham mais rapidamente, podendo rapidamente assumir proporções alarmantes; várias estratégias de avaliação de perigos, comunicação e gestão do risco têm sido desenvolvidas e adoptadas, na base do "do prado ao prato", i.e., desde o início ao fim da cadeia alimentar [57]; curiosamente, os consumidores têm uma percepção dos perigos como sendo resultado de falhas nos sistemas de processamento e de distribuição, subavaliando o seu próprio papel e responsabilidade na manipulação de alimentos e redução do risco [91].

No caso dos ovos, o *American Egg Board* divulga métodos de cocção doméstica aconselhados para ovos em natureza, tendo em vista a inactivação de *S. enteritidis*



[73,92,93]. O CDC (EUA) inclui na sua lista de recomendações para redução do risco de infecção por *S. enteritidis* o uso de ovos pasteurizados em restauração [55].

Subsiste controvérsia acerca de qual deve ser a correcta temperatura de conservação dos ovos desde a produção até ao nível do retalho, fundamentalmente devido à existência de dados científicos contraditórios acerca da possibilidade de crescimento de *S. enteritidis* no albúmen armazenado à temperatura ambiente [57,61,62,72,74,76,94].

A inactivação de patogénicos não esporulados por meio de tratamento térmico é um Ponto Crítico de Controlo na produção e preparação segura de alimentos – insuficiente processamento, cocção ou reaquecimento são frequentemente factores que contribuem para surtos de toxinfecção alimentar [94,95]. As condições de higiene e de manipulação e a contaminação cruzada, mesmo em ambiente doméstico, são simultaneamente um vector fulcral [96,97].

A resistência do microrganismo ao efeito da temperatura varia consoante a natureza dos constituintes onde é avaliada, sendo mais resistente em gema (metade da destruição pelo calor da observada em ovo inteiro), onde a gordura exerce um efeito protector [85]. A mesma gema, quando misturada com a clara (em ovo líquido inteiro), é referida por Cotterill [84] como responsável pela disponibilidade de nutrientes até então ausentes, e pela parcial inactivação da acção da lisozima; de qualquer forma, Durance [98] refere que a lisozima, isoladamente, não inibe a multiplicação de *Salmonella* spp.

#### 8.4- Pasteurização de Ovos e Alta Pressão

Estima-se em 6 milhões o efectivo de galinhas poedeiras no território nacional (0,5% em produção ao ar livre e 0,1% em agricultura biológica), o que constitui um mercado autosuficiente; em Espanha (principal importador, onde os produtores Portugueses obtiveram, em 2003, 15% da quota de mercado) o efectivo é de 32 milhões [99].

Nos EUA, o consumo anual *per capita* é de 234 ovos [57], sendo em Portugal de 161 ovos e 50 ovoprodutos [99], estes provenientes da única indústria produtora de ovoprodutos pasteurizados existente, a empresa DEROVO (Leiria), certificada pela Norma NP EN ISO 9001:2000 acoplado a HACCP igualmente certificado, e com uma capacidade de produção de 7500 litros/hora [100].

Vários modelos de inativação por processamento térmico têm sido desenvolvidos e testados em ovoprodutos [95], conducentes à diminuição do risco no consumo destes produtos e da incidência de toxinfecções, bem como ao aumento do seu tempo de prateleira [75,101]. As condições de pasteurização variam consoante as zonas do Globo Terrestre (**Tabela 8.4.1**).

**Tabela 8.4.1- Condições de pasteurização para ovo líquido**

	<i>Clara</i>	<i>Gema</i>	<i>Ovo inteiro</i>
<i>Estados Unidos</i>	56,7°C a 3,5'	61,1°C a 3,5'	60,0°C a 3,5'
<i>Japão</i>	55-56°C a 3,5'	60,0°C a 3,5'	60,0°C a 3,5'
<i>Reino Unido</i>	57,2°C a 2,5'	64,4°C a 2,5'	64,4°C a 2,5'
<i>Alemanha</i>	56,0°C a 8'	58,0°C a 3,5'	65,5°C a 5'
<i>França</i>	55,5°C a 3,5'	62,5°C a 4'	58,0°C a 4'
<i>Dinamarca</i>	61,0°C a 3'	68,0°C a 4,5'	68,0°C a 4,5'

Adaptado de Kobayashi, Gutierrez e Hatta [86]

Hatta *et al.* [102] referem que a pasteurização diminui a capacidade espumante da clara do ovo, devido à desnaturação da ovotransferrina (63°C); contudo, a sua temperatura de desnaturação pode subir até aos 84°C, se a ovotransferrina estiver associada a Fe, Cu, ou outros iões metálicos; é também conhecido que a adição de sulfato de alumínio à clara se traduz num aumento na temperatura de desnaturação da ovotransferrina.

Os mesmos autores referem ainda que a gema pasteurizada a 62°C durante 5 minutos exibe maior capacidade de emulsificação que a gema não pasteurizada; contudo, a pasteurização a maiores temperaturas causa uma ligeira diminuição nessa capacidade.

A combinação tempo/temperatura é crítica, porque a temperatura requerida para destruir a *Salmonella* é muito próxima daquela que desnatura a albumina, o que torna o processo complexo: p.e., num processamento, as claras são acidificadas com ácido láctico a pH 6,8-7,3, e é adicionado sulfato de amónio para prevenir os danos na albumina provocados pelo calor [52].

Os protocolos da *Food Safety and Inspection Services & USDA (Pasteurization and Estimated Reductions in Salmonella enteritidis Numbers Following Pasteurization)* preconizam, para ovo inteiro, a aplicação de 60°C durante 3,5', com uma redução logarítmica esperada de 8,1 (entre 5,1-17,8 considerando os IC a 95%) [103],

intervalos esses por alguns especialistas considerados demasiado largos [62]. Esta combinação de tempo e temperatura é também adoptada no Brasil para a pasteurização de ovo inteiro [64].

Toledo [64] descreveu a sensibilidade térmica de várias concentrações de *S. enteritidis*, simulando a pasteurização (60°C durante 3,5') em ovo inteiro desidratado reconstituído, e relacionando a sua eficácia mediante a variação quer das temperaturas prévias de incubação das culturas, quer das concentrações iniciais dos microrganismos inoculados. Segundo Toledo, a temperatura de destruição de *S. enteritidis* estaria fundamentalmente ligada à composição do substrato, exercendo as proteínas e lípidos do ovo um efeito protector; adicionalmente, a resistência ao efeito da temperatura aumentaria conforme os aumentos quer da concentração de microrganismos nesse substrato (por maior probabilidade da presença de organismos com diferentes graus de resistência), quer da temperatura de incubação. No entanto, os resultados obtidos não assinalaram diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das duas hipóteses: embora não se registassem sobreviventes à pasteurização em concentrações de  $10^3$  ufc/ml, a incubação a 35°C gerou valores para o factor **D** de 2,54' (em  $10^5$  ufc/ml de meio BHI - *Brain Heart Infusion*) e de 2,57' (em  $10^8$  ufc/ml de BHI), e a incubação a 43°C gerou valores para o factor **D** de 2,58' (em  $10^5$  ufc/ml de BHI) e de 2,40' (em  $10^8$  ufc/ml de BHI).

Na empresa DEROVO, para além do cumprimento dos preceitos legais previstos [104], as combinações tempo/temperatura para pasteurização de ovo líquido inteiro, gema, clara, e ovo cozido, são, respectivamente: 70°C durante 90", 65°C durante 180", 57°C durante 90", e 96°C durante 15' (dados fornecidos pela empresa). A combinação para ovo líquido inteiro corresponde à idealizada por *Ball et al.*, em 1987, como proposta para um novo tratamento de ultra-pasteurização, de modo a garantir cerca de 12 reduções decimais na população de *Salmonella* spp [103].

A pasteurização de ovos e ovoprodutos, principalmente concebida para controlar os serótipos mais frequentes de *Salmonella* e para reduzir o número total de microrganismos, não altera significativamente o seu valor nutricional, mas as propriedades funcionais, sabor e cor podem ser afectadas [38,79,103].

Existem actualmente mais de cem patentes registadas de ovo líquido pasteurizado, cujo desafio consiste na produção de ovo isento de *Salmonella* spp a temperaturas que não o coagulem ou alterem as propriedades das suas proteínas [85,103,105,106].

Tendo em vista os mesmos objectivos, i.e., a obtenção de um produto alimentar seguro mas com alterações mínimas nas suas características intrínsecas, uma aproximação tecnológica alternativa à pasteurização tradicional, baseada no conceito de tratamentos combinados, tem ganho relevância nos últimos anos, em que o processamento por AP assume papel de destaque [101].

Vários estudos têm sido realizados no sentido de aferir variações nas taxas de inactivação de diversos patogénicos de origem alimentar, alguns dos quais em ovoprodutos, tendo ou não *Salmonella* spp como alvo principal. Na aplicação de AP a alimentos, as combinações de tempo, temperatura, e pressurização são críticas, relativamente à capacidade de obter um produto final seguro, mas que simultaneamente vá ao encontro das exigências sensoriais do consumidor.

Yuste *et al.* [107] aplicaram 500 MPa em diferentes combinações de temperatura (50°C, 60°C e 70°C) e tempo (10' e 30') em salsichas de carne de ave inoculadas com  $10^8$  ufc/g de *S. enteritidis*, tendo obtido entre 7,2 e 7,7 reduções logarítmicas de ufc/g quando comparadas com tratamentos térmicos isolados nas mesmas condições,.

Um inóculo inicial de  $10^5$ - $10^6$  ufc/ml de *Salmonella* spp, entre outros microrganismos, foi referido como ausente em compotas, por Horie [18], após tratamento de 294 MPa durante 20', seguido de refrigeração.

Carpi *et al.* [18] inactivaram um inóculo inicial de  $10^3$ - $10^4$  ufc/g de *S. typhimurium* em creme de salmão fumado, após tratamento de 700 MPa durante 3'.

Ponce *et al.* [38] investigaram o potencial de inactivação de *S. enteritidis* de origem alimentar inoculada em ovo líquido inteiro (OLI), usando diversas combinações de pressão (350 MPa, 450 MPa), temperatura (50°C, 20°C, 2°C, -15°C), e tempo de tratamento (5', 10', 15', dois pulsos de 5', três pulsos de 5') no sentido de, consequentemente, avaliar o processo como uma alternativa possível à pasteurização tradicional. Foram usadas concentrações de  $10^7$ - $10^8$  ufc/ml de *S. enteritidis*, armazenadas 18 horas a 4°C após tratamento, diluídas, semeadas e incubadas 24 horas a 37°C. Os resultados obtidos permitiram verificar que a taxa de inactivação foi aumentada pela seguinte ordem de factores: temperatura, pressão e tempo, tendo-se verificado uma mais acentuada e completa inactivação a 450 MPa a 50°C durante 10'.

Ponce *et al.* [45] verificaram também, em OLI inoculado com *Escherichia coli* e *L. innocua*, o efeito sinérgico da AP (300 e 450 MPa durante 10' a 20°C) e da adição

de nisina na inactivação daqueles microrganismos, permitindo não só menor intensidade de tratamento por AP, como aumentando o seu tempo de prateleira (até 30 dias a 4°C). Contrariamente, Lee *et al.* [108], num estudo de tratamentos de processamento por AP combinados com nisina e ultrasons, em ovo líquido inteiro, referem a ausência de efeitos sinérgicos da adição de nisina na inactivação de bactérias de Gram-negativo, pela sua incapacidade de atravessar a membrana citoplasmática.

Num outro estudo em OLI inoculado com *L. innocua*, Ponce *et al.* [109] testaram várias combinações de tempo, temperatura e AP na inactivação da bactéria, sendo a maior taxa de inactivação obtida (nunca total em nenhum dos tratamentos testados) a 450 MPa durante 15' a 20°C.

Lee *et al.* [110] sugeriram que as alterações de fase no ovo líquido inteiro durante os tratamentos de AP afectam a taxa de inactivação de *E. coli*. Dentro dos critérios onde as propriedades reológicas das amostras de OLI foram comparáveis, tratamentos de AP (250-400 MPa) a 5°C verificaram-se ser tão eficazes como a pasteurização térmica tradicional.

Num outro estudo, Lee *et al.* [111] pesquisaram, exclusivamente sob a óptica dos critérios reológicos, a optimização do processamento por AP em ovo líquido inteiro, verificando não existir coagulação a 100 e 150 MPa até 60' a 5°C e a 25°C; a 25°C e 200 MPa, o tempo crítico foi de 47'16'', após o qual ocorreu coagulação.

Lee *et al.* [108] consideram que as melhores condições de processamento por AP para conciliar as propriedades reológicas do ovo (coagulação reduzida ao mínimo) com as cinéticas de inactivação (tão efectivas reduções microbianas quanto o tratamento térmico convencional, segundo os seus próprios estudos) são: 250 MPa durante 14'45'', ou 300 MPa durante 3'20'', à temperatura de processamento de 5°C. Porém, afirmam que, mesmo nestas condições, podem existir microrganismos resistentes, pelo que a aplicação de uma técnica ou tecnologia adicional se torna necessária.

## 8.5- Resistência ao Processamento

Alpas *et al.* [34,112] afirmam estar actualmente bem definido que uma dada espécie de patogénicos alimentares inclui estirpes que são relativamente resistentes à AP em comparação com outras estirpes da mesma espécie, o que pode ser a razão pela qual

existe tanta variação nos resultados obtidos por diferentes investigadores. A variação na resistência à AP necessita de ser suficientemente pesquisada e avaliada [3,112], sendo esta informação crucial para desenvolver parâmetros de pasteurização seguros [113]. Adicionalmente, a falta de informação detalhada sobre as características do processamento (tipo de aparelho, tempos de compressão e descompressão) em numerosos estudos tem dificultado ainda mais a tarefa de comparação entre resultados obtidos e a sua reprodutibilidade.

De igual modo, os resultados na aplicação de AP em matriz alimentar e em laboratório podem ser diferentes (maior e mais rápida disponibilidade de nutrientes essenciais às células sob *stress*, maior volume de interações entre os componentes do alimento, com reflexos nas variáveis intrínsecas que influenciam a resposta microbiana - pH,  $a_w$ ), à semelhança do que acontece com processos de inactivação pelo calor [19,20,22,107], ou seja, os microrganismos tendem a apresentar-se mais estáveis em alimentos. Como regra geral, quanto mais rico for o meio, maior a baroresistência das estirpes [7,114]; no entanto, é aconselhável que cada tipo de alimento deva ser investigado caso a caso, até existir suficiente experiência para construir um modelo mais generalizado [114,115].

Humpheson *et al.* [42] estimaram a razão de subpopulações mais resistentes como sendo de 1 para  $10^4$ - $10^5$ , a partir de 51°C, atribuindo essa resistência a diferenças genotípicas entre a população inicial, protecção acrescida devido à síntese de proteínas de *stress* induzida por habituação subletal, ou uma capacidade diferenciada para as produzir.

Patterson *et al.* [130] avaliaram a variação da resposta de várias bactérias patogénicas ao processamento por AP sendo que, em todos os casos, observaram cinco reduções decimais com tratamentos entre 275-700 MPa a 20°C durante 15'; mais concretamente, para reduções logarítmicas de cinco unidades comparáveis, em tratamentos de 15', a *S. typhimurium* precisou de 350 Mpa, a *L. monocytogenes* de 375 MPa, a *S. enteritidis* de 450 MPa, a *E. coli* de 700 Mpa, e o *St. aureus* de 700 MPa; as bactérias tenderam a ser mais resistentes em leite ultra-pasteurizado que em tampão.

Tem sido referido que as bactérias são relativamente menos sensíveis à pressurização aplicada entre 20°C e 25°C, mas que se tornam muito mais sensíveis acima de 35°C, devido à mudança de fase dos lípidos da membrana [22]. Confirmando esta hipótese,

Alpas *et al.* [113] avaliaram a variação da baroresistência entre estirpes da mesma espécie de vários patogénicos alimentares (entre os quais seis estirpes de *Salmonella*, tendo obtido, com aplicação de 345 MPa durante 5' a 25°C, desde 5,45 reduções decimais na viabilidade de *S. enteritidis* FDA até 8,34 reduções decimais em *S. choleraesuis* ATCC 10708; submetendo posteriormente as estirpes mais resistentes e mais sensíveis de todo o estudo a 345 MPa durante 5', 10' e 15' a 50°C, as diferenças esbateram-se para mais de 6 a 8 reduções decimais em todas, sendo que as estirpes mais resistentes à AP foram igualmente as mais resistentes à temperatura isoladamente.

Algumas estirpes de *Salmonella* spp têm evidenciado níveis relativamente altos de baroresistência, pelo que, e dada a sua relevância epidemiológica, são frequentemente alvo de investigação nesta área [18]. Um dos exemplos é a *S. senftenberg* 775W, também considerada por Álvarez *et al.* [40] como sendo simultaneamente o serótipo de maior resistência à inactivação térmica, levando inclusivamente a que se considere que os processos tradicionais de pasteurização nela não exerçam mais do que uma redução entre 1 e 4 ciclos logarítmicos [103].

As características das culturas, designadamente a sua idade, é também apontado como um factor a ter em conta na variação da resistência, consoante se pretenda usar a AP para esterilizar alimentos ou para reduzir a ocorrência de microrganismos a níveis de risco aceitáveis [18]. Adicionalmente, a eficácia do processamento por AP na inactivação microbiana é referida como dependente da flora microbiana inicialmente presente no alimento e a composição deste [4,38,110].

## 8.6- Processamento Combinado Sequencial

Relativamente à variação da sensibilidade térmica em tratamentos combinados, o desenho do estudo tem bastante interferência no resultado obtido, designadamente ao nível da sequência ou simultaneidade dos tratamentos: aplicar *simultaneamente* AP e temperatura moderada não é equivalente a usá-la *previamente* à aplicação de temperatura moderada [7].

Os próprios desenhos de estudo prosseguem, frequentemente, objectivos distintos, quer seja o estudo da inactivação microbiana, quer a sua redução para níveis aceitáveis de risco, quer ainda a sua sensibilização combinada com outros métodos.

Com efeito, a manipulação inteligente dos processamentos e dos mecanismos biológicos de resposta tem sido estudada para servir objectivos tão distintos como a inactivação microbiológica ou a própria indução de resistência: Ananta e Knorr [25], no âmbito da indústria de alimentos probióticos (optimização de culturas *starter* de *Lactobacillus rhamnosus GG*), utilizaram com sucesso o processamento por AP em baixa intensidade (100-200 MPa) combinado sequencialmente com temperatura, no sentido dos pré-tratamentos de pressão *induzirem* resistência ao tratamento térmico e, consequentemente, maiores níveis de viabilidade e actividade fisiológica durante o processamento e armazenamento. O espectro considerado óptimo para induzir termotolerância foi determinado a 100 MPa e entre 37°C - 43°C, sendo a máxima combinação, estabelecida como limite, de 200 MPa durante 20 minutos a 50°C, ponto após o qual nenhuma perda significativa de viabilidade após pressurização foi observada; acima de 200 MPa, ocorreu a inactivação das células.

Pelo contrário, Linton *et al.* [1], avaliando o efeito sequencial de AP, armazenamento e tratamento térmico na sensibilidade térmica de *E. coli* O157:H7 em leite desnatado, mostraram que um tratamento subletal de AP (200 MPa durante 30 minutos a 30°C) *aumentou* a sua sensibilidade à inactivação térmica imediatamente posterior. Ao nível dos alvos celulares da AP, os autores não detectaram danos ao nível da membrana, e consideraram como hipóteses alternativas que os efeitos se tenham exercido por destruição ribossomal, inactivação enzimática ou degradação de ADN, referidas na literatura publicada sobre esta temática.

## 9. PERSPECTIVAS FUTURAS DAS TECNOLOGIAS ATÉRMICAS

A História tem demonstrado que a investigação científica, quando apropriadamente enquadrada em políticas de gestão da Qualidade alimentar, pode aumentar substancialmente o nível de segurança alimentar dos consumidores; o Séc. XIX produziu numerosos exemplos (refrigeração de alimentos perecíveis, pasteurização do leite, comercialização de alimentos de baixa acidez enlatados); aproximações técnicas mais recentes, como o desenvolvimento do sistema *HACCP*, [91], a implementação de Códigos de Boas Práticas na indústria alimentar e a manutenção de padrões de higiene em estabelecimentos de restauração e em lares domésticos são essenciais para controlar as doenças provocadas por patogénicos de origem alimentar. Contudo, esses procedimentos podem ser insuficientes, isoladamente, para assegurar a segurança microbiológica, tornando necessários novos métodos de preservação de alimentos [4].



Os mecanismos de inactivação microbiana por processos atérmicos não são ainda totalmente claros (faltam ainda mais dados científicos, quantificação e padronização), sendo que a base das combinações sinérgicas permanece, em alguma medida, especulativa [5]; um bom entendimento dos mecanismos de acção de cada tratamento individual é crucial para seleccionar combinações biocidas eficazes [2,115].

As próprias características do processamento por AP levantam algumas dúvidas que só poderão ser respondidas através de experimentação reprodutível, designadamente se se deverá pesquisar com vista à construção de modelos específicos para o processamento por AP, ou considerá-lo, até certo ponto, uma variante do tratamento térmico (devido, por exemplo, ao efeito de aquecimento adiabático de 2°C-3°C por 100 MPa [114]).

Sherry *et al.* [116] calcularam os valores comparativos de dez reduções decimais em 40 estirpes de *Salmonella* após tratamentos isolados de temperatura, AP e Irradiação, verificando a inexistência de uma relação independente entre os diferentes padrões de resistência obtidos. Este estudo evidencia uma questão relevante, que consiste em saber se, adoptando os modelos cinéticos do tratamento térmico, poderemos assegurar que os microrganismos de referência permaneçam os mesmos.

O processamento por AP pode ser considerado como uma nova tecnologia a ser usada em combinação com outros factores de *stress* celular mais convencionais (temperatura, pH,  $a_w$ , substâncias antimicrobianas); contudo, e como se referiu anteriormente, se o processamento por AP for aplicado *em vez* de outro factor de *stress*, a cinética de inactivação microbiana tem que ser conhecida [4,117].

A aplicação de processamentos combinados tem sido proposta como uma aproximação para aumentar o efeito biocida do processamento por AP a intensidades subletais (e baixar significativamente os custos actuais associados ao processo isolado, óbice da sua expansão comercial), baseando-se na combinação sinérgica de doses moderadas de dois ou mais factores que inactivem microrganismos e/ou inibam o seu crescimento [2,22,118], e deste modo reduzindo a severidade de factores usados tradicionalmente na preservação de alimentos.

Como já foi referido, não é aconselhável isolar, em processamento por AP, o efeito desejado quanto à segurança alimentar, e subestimar os seus efeitos no

processamento global, i.e., na qualidade sensorial do produto nesse tratamento [19], o que nos pode conduzir indirectamente a uma aproximação futura mais aberta e integrada do próprio conceito *HACCP*.

O processamento por AP pode afectar a conformação das proteínas e levá-las à desnaturação, coagulação, gelificação, consoante o tipo de proteína, pH, força iónica, e consoante a intensidade de pressão aplicada, o tempo de pressurização e a temperatura a que ela ocorre; no entanto, a transmissão instantânea é uma grande vantagem do processamento por AP sobre o tratamento térmico convencional, em que é frequente ocorrer sobreprocessamento. O facto do processamento por AP ocorrer após embalamento contribui ainda significativamente para eliminar contaminações pós-processamento; outra grande vantagem é o facto de poder ser feita à temperatura ambiente ou próximo dela [111].

Com efeito, as tecnologias atérmicas vêm sendo justamente concebidas para eliminar o uso de temperaturas elevadas durante o processamento, e evitar os seus efeitos adversos no sabor, aparência e valor nutricional de alimentos [21]. No entanto, a temperatura permanece um poderosíssimo factor a ter em conta, sempre que o objectivo consista na inactivação microbiana. Leistner [41], Knorr [115] e Kalchayanand *et al.* [22] propõem que as novas tecnologias atérmicas contribuam para complementar tratamentos térmicos convencionais.

No caso particular do processamento por AP, uma aplicação combinada é quase axiomática para uma significativa expansão do seu emprego no processamento industrial de alimentos - a inerente baroresistência de esporos bacterianos e de algumas enzimas são exemplos dos maiores desafios à sua ampla aplicação [5]; embora o uso de temperaturas na ordem dos 45-50°C em conjunto com pressões entre 500-700 Mpa tenham vindo a ser testadas para inactivar bactérias esporuladas, como o *Cl. botulinum*, ainda não existem sistemas comerciais contínuos a operar [6]. Invertendo o raciocínio de aproximação, pode-se afirmar igualmente que a combinação inteligente de tratamentos térmicos letais com novas tecnologias atérmicas pode ajudar a erradicar subpopulações microbianas problemáticas que mostrem alta resistência a tratamentos atérmicos, com vantagens económicas, de segurança alimentar, e de frescura do produto final.

Em 1991, a *Meydi-ya Food Factory Co*, no Japão, lançou o primeiro alimento comercial (compota) processado por AP para fins de preservação [13,18]. No entanto, a eficácia

do processamento por AP é mais difícil de obter em alimentos de baixa acidez; mesmo em alimentos ácidos, há que ter em atenção as enzimas de degradação (p.e., a polifenoloxidase) como factores limitantes do processamento [18].

Actualmente, existe bastante interesse em alargar a aplicação do processamento por AP a alimentos de baixa acidez, mas há necessidade de estabelecer condições óptimas de processamento para assegurar a segurança microbiológica [1], ou então combinar esta tecnologia a outro factor de processamento, como a temperatura [3], ou ainda conjugá-la simultaneamente com temperatura e pH [34]. A este interesse não é estranho, naturalmente, o facto de se procurar obter uma maior vida de prateleira deste género de produtos alimentares, benefício económico e comercial não desprezível para produtores e retalhistas [105]; o consumidor permanece mais interessado nas características sensoriais do produto final.

Alpas *et al.* [34,113] indicam que os parâmetros para a pasteurização de alimentos por processamento por AP têm que ser desenvolvidos para reduzir populações de células vegetativas por mais de 6 reduções logarítmicas (segundo Kalchayanand *et al.* [22], por mais de 8 reduções logarítmicas), sendo que uma perda de viabilidade desta magnitude pode ser adquirida quer por pressões entre 600-700 MPa durante 15', ou durante 40' a 350 MPa à temperatura ambiente; no entanto, a Qualidade de muitos alimentos ricos em proteínas pode ser afectado de forma adversa por um processamento tão forte ou tão longo, ou seja, o processamento isolado por AP e longos tempos de tratamento não são económicos e podem não ser comercialmente aceitáveis [34], o que realça ainda mais a importância dos tratamentos combinados.

Actualmente, a experiência de utilização do processamento por AP ainda é relativamente curta, mas este sector da indústria alimentar está em franca expansão [119, 120], simultaneamente estimulando a pesquisa científica nesta área e sendo cada vez mais por ela suportada. Num futuro próximo, a indústria alimentar poderá beneficiar bastante com o desenvolvimento de um especificado número de combinações tempo/temperatura/AP, que prove inactivar uma determinada concentração de patogénicos alimentares considerados chave (*E. coli*, *Listeria* spp, *Salmonella* spp, entre outros), o que, por sua vez, permitirá não só estimar mais eficazmente os custos de produção de um determinado produto, como criar e harmonizar o próprio enquadramento legislativo da produção do mesmo.

## II- ESTRATÉGIA E OBJECTIVO DO ESTUDO

Os ovoprodutos pasteurizados de forma tradicional podem apresentar alterações em propriedades importantes na indústria alimentar (capacidade espumante, espessante, gelificante e de ligação), existindo actualmente novos métodos de pasteurização com potencial para minimizar as alterações nas características do produto inicial, com os mesmos níveis de segurança para o consumidor. Dentro destas tecnologias, e devido às suas vantagens de utilização, a AP apresenta-se como a alternativa com maior capacidade de ser empregue em larga escala, e num amplo conjunto de alimentos.

No entanto, o facto de existirem resistências de microrganismos à inactivação por AP leva a que maiores intensidades de processamento tenham que ser utilizadas, o que pode inviabilizar a sua aplicação isolada em ovoprodutos a nível industrial, pela coagulação das proteínas.

Tem sido testado o uso de AP em processamento combinado com a temperatura, mas a sua aplicação simultânea com parâmetros rigorosamente controlados ainda apresenta algumas dificuldades.

Uma nova possibilidade consiste no processamento combinado sequencial, no sentido de induzir, por meio de AP a intensidades subletais, maior sensibilidade a um tratamento térmico imediatamente posterior. Esta sequência, com o uso de pressões relativamente baixas, pode proporcionar uma pasteurização com menores intensidades de tratamento individual, com ganhos na Qualidade do produto e nos custos, especialmente energéticos.

Até à data, poucos estudos científicos foram conduzidos com a aplicação deste tipo de processamento (Ananta e Knorr [25], Linton *et al.* [1]) e, dentro destes, nenhum se refere a ovoprodutos.

Deste modo, o objectivo do presente estudo consistiu na avaliação, em meio de cultura e em OLI, da variação da sensibilidade térmica de *S. enteritidis*, em termos de redução logarítmica de ufc/tempo num dado intervalo de temperaturas, após submissão a um processamento por AP a 200 MPa à temperatura ambiente

### III- MATERIAIS E MÉTODOS

#### 1. Microrganismo (CULTURA BASE UTILIZADA)

O microrganismo em estudo (*S. enteritidis* ATCC 13076, Oxoid) foi semeado em placas de meio *Tryptic Soy Agar* (TSA, Difco, pH=7,3) e incubado a 37°C durante 16-18 horas.

Ao longo de todo o período do estudo, a cultura foi mantida viável em placas de meio TSA, conservadas a 4°C.

#### 2. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CRESCIMENTO

Foram efectuadas pré-culturas em 5 ml de meio líquido *Tryptic Soy Broth* (TSB, Difco, pH=7,3), incubadas em agitador orbital a 250 rpm a 37°C; deste pré-inóculo, foram utilizados 100 µl para inocular cada um de dois *erlenmeyer* contendo 50 ml de meio TSB.

Seguidamente, os *erlenmeyer* foram incubados durante 24 horas em agitador orbital a 250 rpm e a 37°C.

Regularmente, alíquotas de 500 µl foram retiradas e adicionadas a 500 µl de meio TSB, registando-se o valor da Densidade Óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) em espectrofotómetro (Desktop-CaryWinUV 50, EUA).

Todo o procedimento foi efectuado em duplicado, tendo sido utilizada a média dos valores obtidos.

#### 3. CARACTERIZAÇÃO DA TEMPERATURA NO BANHO TERMOSTATIZADO

No banho termostatizado com circulação de água, utilizado em todos os testes, foram efectuadas, em diferentes pontos do banho, medições comparativas para cada temperatura seleccionada, por intermédio de sonda de colo digital (CheckTemp, EUA), sonda termopar (tipo K da Roline, RO-305, Alemanha), ambos com resolução de 0,1°C, e ainda da leitura do próprio termómetro analógico integrado no termóstato do aparelho.

As mesmas sondas foram ainda submetidas a leituras comparativas, quer em gelo, quer em 50 ml de água destilada em ebulição, em *erlenmeyer*.

Esta comparação teve como objectivo caracterizar o grau de precisão na determinação dos intervalos de temperaturas a estudar. Adicionalmente, permitiu a escolha do instrumento a servir como referência de leitura em todos os testes.

#### 4. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE EQUILÍBRIO TÉRMICO

As tampas de microtubos de polipropileno de 250  $\mu$ l foram perfuradas no seu ponto central, e 200  $\mu$ l de meio TSB à temperatura ambiente foram neles colocados. Após fechar os microtubos, foi-lhes introduzido o termopar através da obturação, até ao ponto médio do seu eixo longitudinal, próximo do seu centro geométrico.

Seguidamente, foram mergulhados no banho termostatzado previamente aquecido a cada uma das temperaturas de estudo (52°C a 62°C), tendo-se registado o tempo que o meio TSB demorou a atingir a temperatura do banho.

#### 5. ENSAIOS PRÉVIOS

Foram tidos em conta, a título indicativo, quer os critérios normalizados de processamento na pasteurização de ovos (60°C durante 3,5') [52,64], quer diversos valores do factor **D** (tempo de redução decimal do número inicial de células) publicados referentes ao microrganismo em estudo:  $D_{65^{\circ}\text{C}}=0,025'$  [54],  $D_{60^{\circ}\text{C}}=0,4'$  [38,60],  $D_{60^{\circ}\text{C}}=3,68'$  [113],  $D_{60^{\circ}\text{C}}=0,22'-0,91'$  [42],  $D_{58^{\circ}\text{C}}=0,77'-3,18'$  [38],  $D_{56^{\circ}\text{C}}=3,62'-9,14'$  [42],  $D_{55^{\circ}\text{C}}=6,28'-11,76'$  [54],  $D_{55^{\circ}\text{C}}=10'-12'$  [4],  $D_{50^{\circ}\text{C}}=9,92'$  [113].

##### 5.1- Ensaios Prévios de Inactivação Térmica

No sentido de identificar a gama de temperaturas em que se poderia realizar a inactivação térmica, realizaram-se alguns ensaios prévios, cujos resultados (não mostrados) indicaram como sendo entre 52°C e 62°C.

A temperaturas menores que 52°C a cultura apresentou-se bastante estável, pelo que, para a determinação do factor **D**, seriam necessários tempos de inactivação

muito longos, o que se tornaria impraticável. Pelo contrário, a temperaturas acima de 62°C, a cultura foi rapidamente inactivada, o que impossibilitaria a determinação do factor **D**.

Com os resultados destes ensaios prévios, concluiu-se igualmente que os ensaios deste estudo deveriam ocorrer com intervalos de 2°C de temperatura, dado o valor do factor **z** estimado (temperatura necessária para comportar uma redução decimal em **D**) ser relativamente baixo.

## 5.2- Ensaios Prévios de Inactivação Térmica após Tratamentos de Alta Pressão

A cultura em estudo foi submetida a tratamento de Alta Pressão (200 MPa à temperatura ambiente), e foram realizados ensaios de inactivação térmica, com o objectivo de, consoante o seu comportamento, delimitar a gama de temperaturas em que seria mais adequado realizar os ensaios definitivos.

Com os resultados obtidos (não mostrados), verificou-se que a cultura submetida a Alta Pressão apresentou menor resistência ao tratamento térmico, e concluiu-se que a gama de temperaturas a usar deveria ser entre 50°C e 56°C.

No entanto, dada a inexistência de dados comparativos de inactivação térmica a 50°C com cultura não submetida a Alta Pressão, optou-se por realizar os ensaios definitivos entre 52°C e 56°C.

Os resultados permitiram ainda concluir, de igual forma à anteriormente descrita nos ensaios prévios de inactivação térmica, que as inactivações deveriam ocorrer com intervalos de 2°C de temperatura, pelo que foi decidido realizar as inactivações após Alta Pressão nas temperaturas de 52°C, 54°C e 56°C.

## 6. INACTIVAÇÃO TÉRMICA

### 6.1- Preparação da Cultura

No dia anterior à realização de cada ensaio de inactivação térmica, um *erlenmeyer* contendo 50 ml de meio TSB foi inoculado com uma colónia isolada pura proveniente

da cultura base em meio TSA, e mantido em agitador orbital (250 rpm) a 37°C durante 16 horas.

## 6.2- Determinação da Densidade Óptica

Após o período de incubação, foi lida a  $DO_{600nm}$  de uma alíquota.

A experiência obtida ao longo dos vários ensaios prévios mostrou resultados mais consistentes mediante o uso de culturas diluídas com  $DO_{600nm}$  compreendida entre 0,6 e  $0,8 \times 10^8$  ufc/ml.

## 6.3- Ensaios de Inativação Térmica

Foram preparados e marcados, para cada tempo pré-determinado, microtubos de 250µl previamente esterilizados contendo 200 µl de cultura em meio TSB. Seguidamente, foram colocados em suporte e mergulhados no banho-maria previamente aquecido à temperatura de ensaio. A temperatura de referência utilizada foi a da sonda (CheckTemp) no interior do banho, lida à mesma profundidade que o recipiente de ensaio.

À medida que atingiram cada tempo pré-determinado, os microtubos foram retirados e arrefecidos a 4°C, até à quantificação dos microrganismos sobreviventes.

## 6.4- Diluições, Sementeiras e Contagens

É referida, nalguma literatura científica existente, uma fonte de erro adicional na contagem tradicional em placa, por não ter em consideração o aumento da biomassa (ausência de septo, mas existência de crescimento por alongamento e filamentação, observando-se a presença de nucleóides regularmente espaçados), gerada por certas condições marginais de crescimento (p.e.,  $a_w$  0,95, ou 4-8°C), o que pode levar à subestimação do número de potenciais unidades infecciosas presentes num alimento, e à própria quantificação de dose infecciosa [63,121]. Quando as condições óptimas de crescimento eventualmente regressam, a septação é muito rápida e pode desencadear um grande aumento de ufc [122].

Adicionalmente, quando a dose considerada infecciosa é muito pequena, Bozoglu *et al.* [123] consideram importante que o método de contagem para verificação da eficácia do tratamento aplicado seja o mais fiável possível; Peck *et al.* [124] sublinham ainda



que os métodos de contagem aeróbicos podem não reflectir a totalidade das células em dano subletal, por estas poderem recuperar melhor em meio anaeróbio.

Kalchayanand *et al.* [22], após tratamentos de AP nalguns patogénicos de origem alimentar, cultivaram-nos em meio selectivo e não selectivo, no sentido de determinar células viáveis (ufc em TSYAgar) e células não-lesionadas (ufc em meio selectivo); a diferença existente observada permitiu a estimativa de sobreviventes lesionados, ou seja, células que, conseguindo formar colónias, apenas o conseguem fazer em meio não selectivo.

Também Ponce *et al.* [38] adoptaram procedimento semelhante comparando a inactivação por processamento por AP de *S. enteritidis* inoculada em ovo líquido inteiro, e assinalaram diferenças entre contagens em meio selectivo e não-selectivo. Este factor pode ter maior importância para o estudo de laboratório do que em matriz alimentar, dado que os alimentos de baixa acidez são, por si só, ambientes pouco selectivos ao crescimento de microrganismos.

Apesar do exposto, a literatura científica de revisão desta temática não refere como prioritária a necessidade de mudar os métodos que visam a contagem de células viáveis usando em particular o processamento por AP, apenas se referindo que o meio usado na sementeira deve ser rico [18], indicação seguida neste estudo, cujo objectivo pretendeu aferir a viabilidade absoluta da cultura base, tendo-lhe sido proporcionadas as condições ideais para a sua recuperação após qualquer dos tratamentos aplicados.

Deste modo, as culturas testadas neste estudo foram, e segundo as boas práticas vigentes no laboratório, imediatamente diluídas (quando necessário, para concentrações entre  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  da original), semeadas em duplicado em placas de meio TSA (100 µl), e incubadas a 37°C durante 16-18 horas, após o que se procedeu à contagem de ufc.

O tempo zero de tratamento térmico ( $T_0$ ), i.e., a cultura não tratada termicamente, foi igualmente diluído e semeado em placa, sendo que as contagens de ufc assim obtidas foram consideradas como o valor de  $N_0$  (número inicial de ufc).

As placas com meio TSA que não apresentaram crescimento, após qualquer dos tipos de tratamento, não foram consideradas válidas para a análise estatística dos resultados. No total do estudo, foram semeadas 3129 placas.

Nos estudos de alguns autores, a contagem foi efectuada ao fim de diferentes tempos de incubação: 48 horas, nos casos de Alpas *et al.* [112,113], Kalchayanand *et al.* [22] e Blackburn *et al.* [95]; 24 horas no caso de Ponce *et al.* [38]. A experiência obtida através dos ensaios prévios e da curva de crescimento indicou a inexistência de necessidade de incubar por períodos superiores a 16-18 horas, dado o rápido crescimento das colónias incubadas a 37°C, e o facto de não se registar nenhum aumento no número de ufc após esse período.

## 7. TRATAMENTOS DE ALTA PRESSÃO

### 7.1- Preparação da Cultura

No dia anterior ao de cada teste, um *erlenmeyer* contendo 50 ml de meio TSB foi inoculado com uma colónia pura proveniente da cultura base em meio TSA, e mantido em agitador orbital (250 rpm) a 37°C durante 16 horas.

### 7.2- Tratamentos de Alta Pressão a 200 MPa

Em cada tratamento de AP (durante 5', 15' e 30'), foram utilizados dois sacos de polietileno (área aproximada de 10 cm<sup>2</sup>), previamente esterilizados por UV.

Em cada saco foram colocados 20 ml de cultura inicial diluída em meio TSB, de modo a perfazer uma DO<sub>600nm</sub> entre 0,6 e 0,8.

Posteriormente, foi-lhes extraído tanto ar quanto possível, tendo sido seguidamente selados termicamente (Soldadora Manual SK-300, da Loverbo - Itália, Albipack, Águeda - Portugal) em condições de assepsia, manualmente agitados para homogeneizar a cultura, e colocados num outro saco de polietileno, ao qual foi retirado por vácuo (Máquina de vácuo Vacupack 2, da Krups - França) tanto ar quanto possível e aplicada nova selagem térmica.

Da restante cultura inicial foram retirados alíquotas para estabelecimento do N<sub>0</sub>, e para inactivação térmica a 52°C e a 56°C sem tratamento de AP, como controlo.

Os testes de AP a 200 MPa foram realizados à temperatura ambiente (cerca de 20°C), no Departamento de Cerâmica da Universidade de Aveiro, numa prensa hidrostática (**Figura 7.2.1**) da Autoclave Engineers Inc., Erie, Pennsylvania - USA, com diâmetro

interno de 8 cm e altura utilizável de 55 cm, e utilizando um fluido de mistura de água (90%) e óleo lubrificante solúvel (10%) da Kluber, CO 6-468 PS.



**Figura 7.2.1- Prensa hidrostática utilizada no estudo (Departamento de Cerâmica e do Vidro da Universidade de Aveiro)**

Os tempos de Compressão (*come-up*), Pressão Efectiva (*hold*) e Descompressão (*release*) foram registados por cronometragem manual, e encontram-se na **Tabela 7.2.1.**

**Tabela 7.2.1- Tratamentos de Alta Pressão a 200 MPa**

<i>Come-up</i>	<i>Hold</i>	<i>Release</i>
2'	5'	1'52"
2'	15'	50"
1'27"	30'	50"

### 7.3- Tratamentos de Alta Pressão a 300 MPa

Para o ensaio descrito no ponto 7 do Capítulo **IV** (300 Mpa durante 5' à temperatura ambiente), foi utilizada uma segunda prensa hidrostática do Departamento de Cerâmica da Universidade de Aveiro, da Stansted Fluid Power, LTD., Essex - UK, com diâmetro interno de 10 cm e altura utilizável de 30 cm, e usando como fluido uma mistura de água (90%) e óleo lubrificante solúvel (10%) da Kluber, CO 6-468 PS.

A preparação das amostras para este ensaio (meio de cultura e ovo líquido inteiro não inoculado) foi idêntica aos ensaios correspondentes a 200 MPa, descritos neste Capítulo.

## 8. ENSAIOS DE INACTIVAÇÃO TÉRMICA APÓS TRATAMENTOS DE ALTA PRESSÃO

Imediatamente após cada tratamento de AP, um dos dois sacos foi mantido a 4°C durante 7 dias, altura em que os ensaios de inactivação térmica foram repetidos, permitindo-se que a cultura atingisse a temperatura ambiente antes de se iniciarem os ensaios.

O outro saco com cultura submetida a AP foi imediatamente descerrado em ambiente estéril, e o seu conteúdo pipetado em volumes de 200 µl para microtubos de 250 µl previamente esterilizados, para se proceder aos ensaios de inactivação térmica.

Seguidamente, os microtubos foram colocados em suporte apropriado e mergulhados no banho termostatzado previamente aquecido a cada temperatura de ensaio. Foi retirada uma alíquota para controlo do efeito isolado do tratamento de AP (denominado como  $P_0$ , que significa de facto o valor de  $N_0$  após o tratamento de AP, i.e., o  $T_0$  dos tratamento térmico das culturas previamente submetidas a AP).

À medida que atingiram os tempos pré-determinados para cada temperatura, os microtubos foram retirados, arrefecidos a 4°C, procedendo-se às diluições, sementeiras em placas de meio TSA, incubação e contagens, nos mesmos moldes dos testes de sensibilidade térmica anteriormente descritos em 6.4.

Nos trabalhos de Alpas *et al.* [113] em patogénicos de origem alimentar submetidos a AP, os valores dos parâmetros cinéticos, quando não se contaram sobreviventes após 5' de um determinado tempo de tratamento, foram estimados dividindo por 5 o Log ufc/ml inicial. Este procedimento foi considerado inadequado face aos objectivos deste trabalho, pelo que, e como já foi referido, as placas com meio TSA que não apresentaram crescimento após qualquer dos tipos de tratamento, não foram consideradas válidas para a análise dos resultados.

## 9. TESTES EM OLI

Para a realização de ensaios similares em OLI, foi necessário adaptar a metodologia de modo a ter em consideração algumas diferenças fundamentais: a esterilidade do ovo, a sua homogeneidade e a sua inoculação.

### 9.1- Preparação da Cultura

No dia anterior ao de cada ensaio, um *erlenmeyer* contendo 50 ml de meio TSB foi inoculado com uma colónia pura proveniente da cultura base em meio TSA, e mantido em agitador orbital (250 rpm) a 37°C durante 16 horas.

### 9.2- Preparação do Ovo

Foram adquiridos na véspera de cada ensaio ovos em natureza num hipermercado de Aveiro - Ovo Camponês (Casa do Aído, Lda), Classe M (53/63g), Categoria A, Centro de Inspeção nº PT 053 ALDP.

Os ovos foram conservados refrigerados na sua embalagem original até ao momento da sua esterilização.

Board *et al.* [81] referem que, nas condições comerciais de armazenamento à temperatura ambiente (constante nos retalhistas nacionais), há um intervalo de tempo de 10 a 20 dias entre a penetração da casca inoculada com *Salmonella* e a sua ocorrência no albúmen em grande número. Também por este motivo, os ovos adquiridos para este estudo foram os mais frescos que se encontravam disponíveis.

Com base na metodologia seguida nos trabalhos de Lee *et al.* [108,111], e considerando a elevada probabilidade de esterilidade interna do ovo em natureza, no dia de cada teste foram lavados os ovos necessários com água destilada, mergulhados em álcool a 70% durante 10 minutos, tendo-se deixado secar ao ar em condições de assepsia.

Posteriormente, os ovos foram quebrados em ambiente estéril para um *erlenmeyer*, perfurada a membrana vitelina com uma vareta, e manualmente agitados para homogeneização.

Após esta operação, inoculou-se 1 ml da cultura (preparada como descrito em 9.1) por 100 ml de ovo, de forma a obter duas reduções decimais e efectuar os ensaios de inactivação térmica numa ordem de grandeza esperada de  $10^6$  ufc/0,1 ml de ovo, que as contagens em placa viriam a confirmar. Por fim, a suspensão foi novamente homogeneizada manualmente.

### 9.3- Ensaios de Inativação Térmica

A metodologia seguida com o ovo inoculado foi idêntica à utilizada nos ensaios efectuados em meio de cultura, (incluindo diluições, sementeiras e contagens), com excepção da grelha de estudo, que incluiu 4 temperaturas: 50°C, 52°C, 54°C e 56°C, i.e., as temperaturas com tempos de inactivação mais longos, logo sujeitas a menores erros experimentais.

Foram semeadas alíquotas, quer da cultura inicial em meio TSB, quer do OLI inoculado, para estabelecimento do  $N_0$ .

### 9.4- Tratamentos de Alta Pressão a 200 MPa

A metodologia seguida com o OLI inoculado foi idêntica à utilizada nos ensaios efectuados em meio de cultura, com excepção dos tempos de pressurização efectiva, que foram apenas de 15' e 30'.

Os testes de AP a 200 MPa foram realizados à temperatura ambiente na mesma prensa hidrostática usada para os tratamentos com a cultura em meio TSB.

Os tempos de Compressão (*come-up*), Pressão Efectiva (*hold*) e Descompressão (*release*) foram registados por cronometragem manual, e os seus resultados encontram-se na **Tabela 9.4.1**.

**Tabela 9.4.1- Tratamentos de Alta Pressão a 200 MPa (OLI)**

<i>Come-up</i>	<i>Hold</i>	<i>Release</i>
1'15''	15'	32''
1'30''	30'	32''

### 9.5- Ensaios de Inativação Térmica após Tratamentos de Alta Pressão

Os sacos com OLI inoculado submetido a AP foram descerrados em ambiente estéril, e o seu conteúdo pipetado em volumes de 200  $\mu$ l para microtubos de 250  $\mu$ l previamente esterilizados, à semelhança dos ensaios efectuados em meio de cultura.

As temperaturas usadas para a inactivação térmica após tratamentos de AP (a 15' e a 30') foram as mesmas utilizadas nos ensaios para a inactivação térmica não submetida a tratamentos de AP: 50°C, 52°C, 54°C e 56°C.

Foram efectuados ensaios de inactivação térmica para controlo, a 52°C e 56°C, a partir da mesma amostra de OLI inoculado que não foi sujeita a tratamentos de AP.

Procedeu-se às diluições, sementeiras em placas contendo meio TSA, incubação e contagens, nos moldes já anteriormente descritos no ponto 6.4, exceptuando a gama de diluições, que neste caso abrangeram concentrações entre  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  da original.

## 10. ANÁLISE DOS DADOS EXPERIMENTAIS

Na aproximação tradicional para estabelecer uma inactivação por tratamento térmico, assume-se que todos os organismos numa população são idênticos e que a sua inactivação pode ser descrita como uma taxa de inactivação logarítmica linear (cinética de primeira ordem) [95]; esta aproximação serviu a indústria nos últimos 50 anos e, até à data, forma a base da maioria dos processos térmicos comercialmente aplicados, considerando-se actualmente necessário desenvolver e validar parâmetros de processamento por AP no que respeita à inactivação microbiana, essencial à expansão da comercialização desta tecnologia [6,7,114,117].

Contudo, os padrões da cinética de inactivação em processamento por AP observados em diferentes microrganismos são bastante variáveis: alguns autores indicam uma cinética de primeira ordem no caso de várias bactérias e leveduras; outros observam uma alteração no declive e um fenómeno de inactivação bifásica, com uma primeira fracção da população inicial a ser rapidamente inactivada, enquanto uma segunda fracção permanece mais resistente, com ocorrência de *caudas* de sobrevivência, e com possibilidade de recuperação após tratamento [4,117].

Têm-se tentado [46,61,87,95,125] desenvolver modelos matemáticos integrados que possibilitem a modelização de curvas sigmoidais, não inteiramente previstas pelos modelos mais comuns (Cinética de primeira ordem - curva de sobrevivência linear; modelo de Buchanan - curva de sobrevivência com *ombro* inicial; modelo de Cerf - curva com *cauda* de sobrevivência).

## 10.1- CÁLCULO DA CONSTANTE CINÉTICA

Verificou-se que a inativação térmica da cultura usada neste estudo seguia uma cinética de primeira ordem. Para este tipo de cinética, a diminuição do número de ufc em função do tempo de inativação, a temperatura constante, é descrita matematicamente, da seguinte forma:

$$N = N_0 \times \exp(-kt) \quad \text{eq 10.1.1}$$

Em que  $N$  é o número de microrganismos sobreviventes após um tempo  $t$  (minutos) de inativação,  $N_0$  o número inicial de microrganismos, e  $k$  a constante cinética de inativação ( $\text{minutos}^{-1}$ ).

A equação 10.1.1 pode ser logaritimizada e rearranjada de modo a obter-se a equação 10.1.2:

$$\text{Ln}\left(\frac{N}{N_0}\right) = -kt \quad \text{eq 10.1.2}$$

A constante cinética,  $k$ , pode assim ser estimada por regressão linear, o que foi feito neste trabalho, usando o procedimento de regressão linear do *software* Excel 2003 (Microsoft, Seattle, EUA). Para estimar as constantes cinéticas, para cada tempo de inativação a cada temperatura, foram usados as contagens dos replicados em placa com meio TSA e não o valor da sua média, enquanto nos gráficos foram usados os valores médios.

## 10.2- TESTES DE SIGNIFICÂNCIA

Para verificar a ocorrência de efeitos estatisticamente significativos causados pelos tratamentos de pressão na resistência à inativação térmica da cultura, foram realizados testes de significância. Assim, a constante cinética (declive da curva) obtida a cada temperatura de inativação para a cultura submetida a AP foi comparada, em termos estatísticos (teste bilateral), com a constante cinética obtida à temperatura de inativação para a cultura não submetida a AP, através do teste  $t$  de *student*. O valor de  $t$  estatístico foi calculado do seguinte modo [126]:



$$t = \frac{|k_p - k|}{s_{kp}} \quad \text{eq 10.2.1}$$

Em que  $k_p$  e  $k$  são, respectivamente, a constante cinética que se pretende comparar e a constante cinética usada para comparação, a uma determinada temperatura, e  $s_{kp}$  o desvio padrão obtido na regressão para o  $k_p$ .

O valor crítico de  $t$  foi obtido da tabela de distribuição dos valores críticos de  $t$  de *student*, considerando  $t_{\alpha/2, n-1}$  [127]. Como hipótese nula,  $H_0$ , considerou-se  $k_p = k$  e hipótese alternativa,  $H_1$ :  $k_p \neq k$ . Como ponto de partida, considerou-se um nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Nos casos em que se verificou a hipótese alternativa,  $H_1$ :  $k_p \neq k$ , ( $p < 0,05$ , estatisticamente significativo), o teste estatístico foi repetido, para níveis de significância sucessivamente menores, para verificar se os resultados eram altamente significativos ( $p < 0,01$ ).

### 10.3- CÁLCULO DO FACTOR **D**

Por questões práticas, na área da conservação de alimentos por processamento térmico, não se usa a constante cinética, mas sim o factor **D** (minutos), sendo que este último parâmetro é calculado a partir do primeiro do seguinte modo:

$$k = \frac{\text{Ln}(10)}{D} \quad \text{eq 10.3.1}$$

Em termos práticos e intuitivos, o factor **D** (ou tempo de redução decimal) é o tempo necessário, em minutos, para obter uma redução de 90% (para 10% do valor inicial) no número inicial de microrganismos a uma determinada temperatura [7,38,60,122].

Para que se pudessem calcular os intervalos de confiança dos factores **D** determinados, apresentados nas tabelas e gráficos do Capítulo IV, é necessário conhecer o desvio padrão dos mesmos. Para isso, recorreu-se ao cálculo do desvio padrão do factor **D**, a partir do desvio padrão da constante cinética (obtido da regressão linear), usando a seguinte fórmula de propagação de erros [126]:

$$\frac{s_D}{D} = \sqrt{\left(\frac{s_k}{k}\right)^2} \quad \text{eq 10.3.2}$$

Em que  $s_D$  e  $s_k$  são, respectivamente, os desvios padrões do factor **D** e da constante cinética,  $k$ .

Os limites dos intervalos de confiança foram calculados, ao nível de significância de 5%, usando a seguinte expressão [126]:

$$D \pm t_{\alpha/2, n-2} \times s_D \quad \text{eq 10.3.3}$$

#### 10.4- CÁLCULO DO FACTOR **z**

O factor **z** é usado na área do processamento alimentar para quantificar o efeito da temperatura na destruição de microrganismos, à semelhança da energia de activação para reacções químicas e bioquímicas. O factor **z** é definido como a variação de temperatura, em °C, que causa uma variação (aumento ou diminuição) de um ciclo logarítmico no factor **D** [60,122]; i.e., o factor **z** é a variação de temperatura que causa uma variação por um factor de 10 no factor **D**. Os factores **D** e **z** relacionam-se matematicamente do seguinte modo:

$$D = D_0 \times 10^{\left(\frac{T}{z}\right)} \quad \text{eq 10.4.1}$$

Para calcular o factor **z**, aplicam-se logaritmos decimais a ambos os membros da equação 10.4.1, obtendo-se uma forma linearizada da mesma:

$$\text{Log}(D) = \text{Log}(D_0) - \frac{T}{z} \quad \text{eq 10.4.2}$$

Como se pode verificar pela equação 10.4.2, se se fizer um gráfico de Log (**D**) em função do inverso da temperatura, obter-se-á uma recta, cujo declive é igual ao inverso simétrico do factor **z**.

O factor **z** foi determinado a partir do declive, obtido da regressão linear usando o procedimento de regressão linear do *software* Excel, aplicado à equação 10.4.2. O intervalo de confiança para o factor **z** foi determinado usando o procedimento utilizado para o do factor **D**.

### 10.5- FACTORES ***D*** E ***z***, TEMPERATURA E PRESSÃO

Uma nota final deve ser feita referente à descrição acima apresentada da definição e do cálculo dos factores ***D*** e ***z***. Estes dois factores ou parâmetros cinéticos foram desenvolvidos para serem aplicados no âmbito do processamento térmico de alimentos, pelo que a sua definição e cálculo se fez sempre relativamente à temperatura. Contudo, com o surgimento de alimentos pasteurizados por AP, a pertinência de calcular o efeito da AP na cinética de inactivação de microrganismos (factor ***D***) e da variação da AP no factor ***D*** (factor ***z***), levou a que se tenha adoptado outra terminologia: assim, actualmente, quando se apresentam valores para os factores ***D*** e ***z***, relacionados com o processamento térmico, estes factores são simplesmente apresentados como ***D*** e ***z***; quando se apresentam valores para os factores ***D*** e ***z*** relacionados com processamento por AP, estes factores são apresentados como ***D<sub>p</sub>*** e ***z<sub>p</sub>***. Uma vez que neste trabalho se determinaram os factores ***D*** e ***z*** apenas relacionados com inactivação térmica, empregou-se a terminologia ***D*** e ***z***.

## IV- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CRESCIMENTO

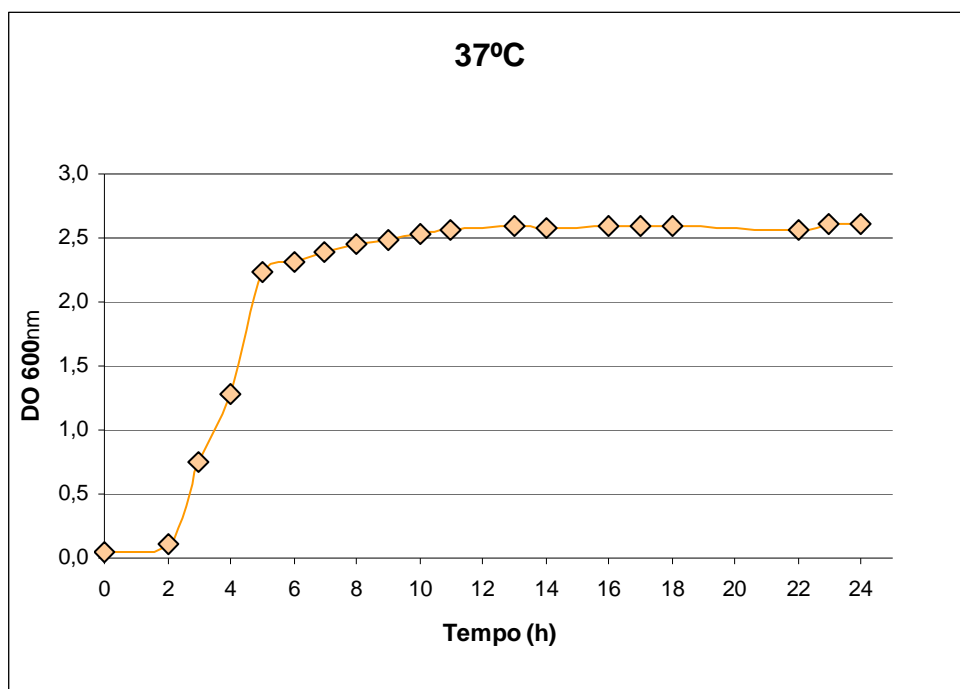
Alguns autores [20,34,38,42,113] referem variações no grau de sensibilidade de espécies bacterianas a tratamentos de pressão e temperatura consoante a fase de crescimento em que se encontram no momento dos ensaios.

Os resultados de Pagan e Mackey, em 1999, em estirpes baroresistentes e barossensíveis de *E. coli* mostraram que as células na fase exponencial de crescimento são sensíveis à aplicação de AP e que não conseguem, após a descompressão, restaurar as membranas afectadas pela pressão, ao contrário do que parece acontecer com as células em fase estacionária [18].

Relativamente a estudos com *S. enteritidis*, Alpas *et al.* [34] utilizaram a *S. enteritidis* FDA na fase exponencial, enquanto que Masschalsk *et al.* [2] usaram a mesma estirpe que a do presente estudo (*S. enteritidis* ATCC 13076) na fase estacionária; ainda Ponce *et al.* [38] e Humpheson *et al.* [42] usaram estirpes de *S. enteritidis* na fase estacionária, justamente por aí apresentar maior resistência.

Dado o objectivo do presente estudo, foi considerado adequado realizá-lo com a cultura na fase de crescimento com maior resistência, pelo que se avaliou o seu perfil de crescimento à temperatura óptima de crescimento (37°C), por determinação da DO<sub>600nm</sub> durante 24 horas.

Os dados obtidos encontram-se no **Gráfico 1.1**, onde se pode verificar que a fase exponencial decorreu entre as 2 e as 6 horas, tendo-se considerado adequado incubar as culturas para ensaios térmicos e de AP durante 16 horas, de forma a estudar o impacto dos tratamentos na fase estacionária.



**Gráfico 1.1 - Curva de crescimento de *S. enteritidis* a 37°C**

## 2. CARACTERIZAÇÃO DA TEMPERATURA NO BANHO TERMOSTATIZADO

A submissão das sondas a leituras comparativas em gelo e em 50 ml água destilada em ebulição em *erlenmeyer*, traduziu-se numa equivalência de valores finais registados. Por motivos de disponibilidade de instrumento, optou-se por fixar a sonda de colo digital como instrumento de referência.

Verificou-se a existência de uma discrepância constante de 0,8°C entre os valores de temperatura registados pelas sondas ao nível do local de imersão dos recipientes de ensaio e aqueles lidos no termómetro analógico incorporado pelo banho-maria, valor esse que passou a ser adicionado na regulação do banho a cada uma das temperaturas de ensaio.

## 3. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE EQUILÍBRIO TÉRMICO

O registo da condução de calor nos microtubos contendo meio TSB mostrou que, numa gama de temperaturas desde os 50°C até aos 60°C, a temperatura aferida no ponto médio do seu eixo longitudinal foi igual à do banho termostaticado cerca de 1'

após a sua introdução. Para as temperaturas de 60°C e 62°C, o ponto de equilíbrio térmico determinado foi de aproximadamente 45" após introdução no banho.

Deste modo, dado que os tempos de equilíbrio foram determinados como sendo bastante menores que os tempos de tratamento térmico utilizados neste estudo, não se procedeu a nenhuma correcção, i.e., considerou-se o  $T_0$  dos ensaios como o momento em que os microtubos viriam a ser colocados no banho.

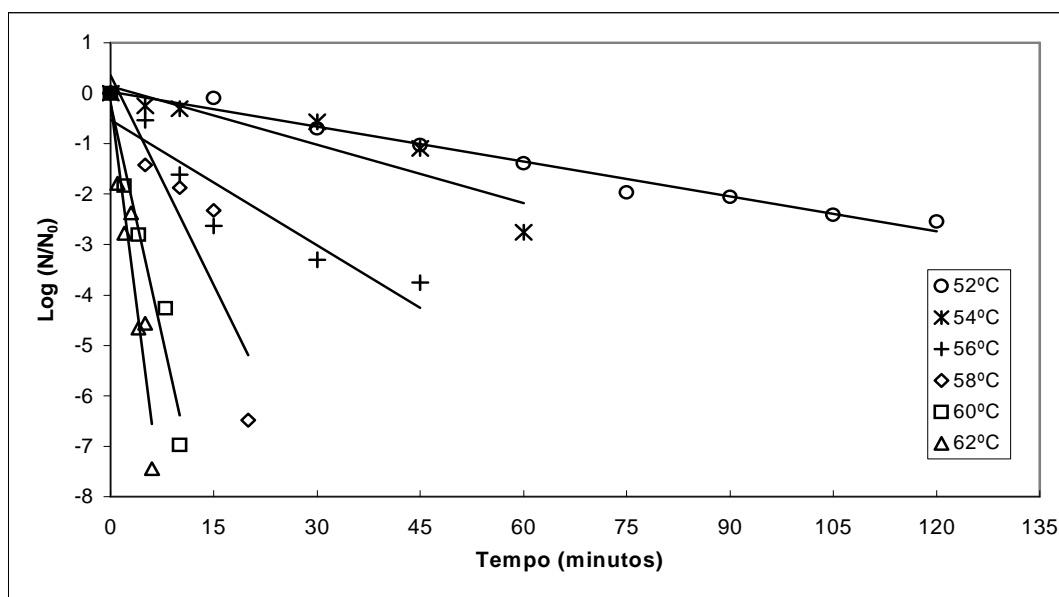
#### 4. INACTIVAÇÃO TÉRMICA

Na gama de temperaturas previamente seleccionada (52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C e 62°C), foram realizados dois conjuntos de ensaios, distintos quanto ao momento em que foram efectuados, a que desde já se convencionou denominar como Série A e Série B. Este procedimento foi adoptado para uma melhor caracterização dos parâmetros cinéticos.

Os resultados obtidos nas duas Séries encontram-se registados nas **Tabelas 4.1 e 4.2**, respectivamente ilustradas pelos **Gráficos 4.1 e 4.2**, verificando-se em ambas uma cinética de inactivação de primeira ordem. Em todo o trabalho se usa a abreviatura "IC 95%", que significa "Intervalo de Confiança a 95%", i.e., com 5% de significância.

**Tabela 4.1 - Inactivação térmica de *S. enteritidis* (Série A)**

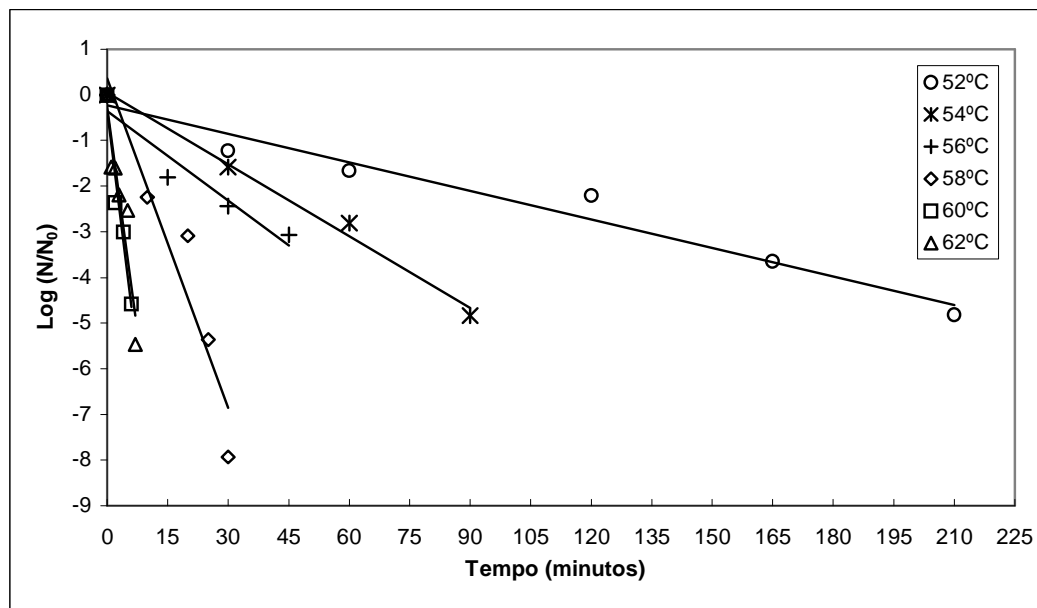
<b>Temperatura</b> ( $N_0 = 1,43 \times 10^8/0,1$ ml)	<b>n</b>	<b>k</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>D ± IC 95%</b> (min)
52°C	18	0,055	0,969	1,91	41,8 ± 4,1
54°C	12	0,105	0,867	2,72	22,0 ± 6,1
56°C	12	0,192	0,840	1,85	12,0 ± 4,3
58°C	10	0,538	0,725	0,88	4,28 ± 2,0
60°C	10	1,269	0,921	0,20	1,81 ± 0,47
62°C	14	2,243	0,862	0,12	1,03 ± 0,26
<b>z ± IC 95% (°C)</b>	<b>6</b>	<b>0,168</b>	<b>0,992</b>	<b>0,25</b>	<b>5,93 ± 0,70</b>



**Gráfico 4.1 – Curvas de inativação térmica de *S. enteritidis* (Série A)**

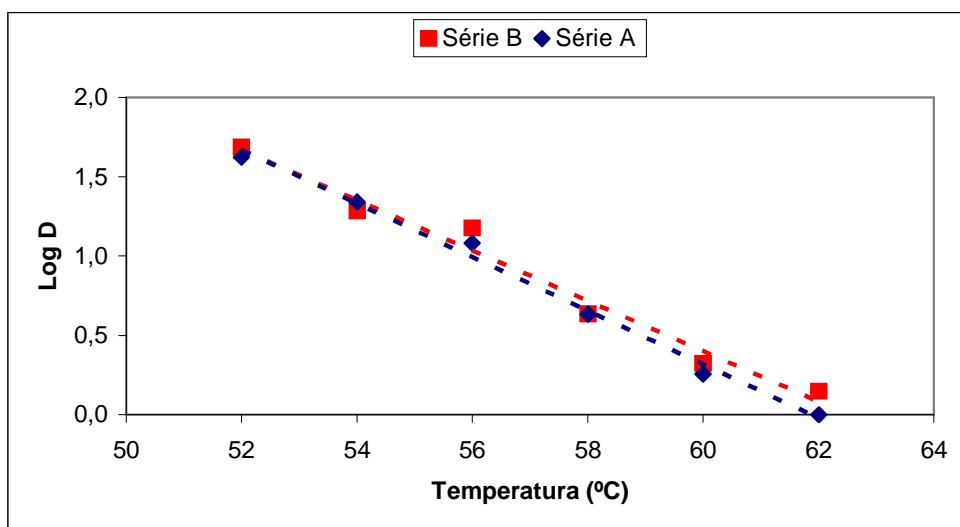
**Tabela 4.2 - Inativação térmica de *S. enteritidis* (Série B)**

<b>Temperatura</b> ( $N_0 = 1,18 \times 10^8/0,1$ ml)	<b><i>n</i></b>	<b><i>k</i></b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b><math>D \pm IC\ 95\%</math> (min)</b>
52°C	12	0,047	0,920	4,50	$48,3 \pm 10,0$
54°C	8	0,119	0,975	1,07	$19,2 \pm 2,5$
56°C	8	0,153	0,923	2,17	$15,0 \pm 6,0$
58°C	10	0,531	0,888	0,52	$4,34 \pm 1,17$
60°C	8	1,104	0,736	0,51	$2,09 \pm 1,25$
62°C	12	1,608	0,893	0,16	$1,43 \pm 0,37$
<b><math>z \pm IC\ 95\%</math> (°C)</b>	<b>6</b>	<b>0,159</b>	<b>0,976</b>	<b>0,25</b>	<b><math>6,30 \pm 1,35</math></b>



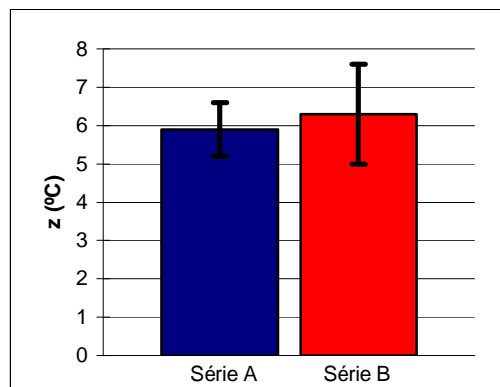
**Gráfico 4.2 - Curvas de inativação térmica de *S. enteritidis* (Série B)**

No **Gráfico 4.3** são apresentadas as curvas logaritmizadas realizadas para determinação do factor  $z$ , a partir dos factores  $D$  das duas Séries. O **Gráfico 4.4** apresenta os valores de  $z$  de ambas as séries, em que as barras de erro do gráfico representam os IC a 95%.



**Gráfico 4.3 - Determinação do factor  $z$  de *S. enteritidis***





**Gráfico 4.4 - Valor do factor  $z$  para a inactivação térmica de *S. enteritidis***

A análise estatística aos valores dos factores  **$D$**  e  **$z$**  das duas Séries permitiu concluir não existirem diferenças significativas entre si, i.e., verificou-se serem as Séries estatisticamente iguais.

Assim, os dados das Séries A e B foram combinados, de forma a se obterem valores para os factores  **$D$**  e  **$z$**  resultantes do uso de todas as observações (**Tabela 4.3**); um maior número de dados experimentais permitiu uma melhor caracterização dos parâmetros cinéticos da cultura.

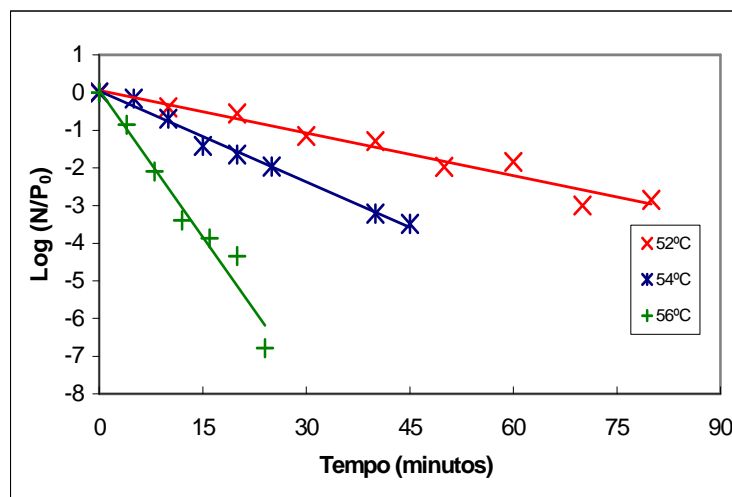
**Tabela 4.3 - Inactivação térmica de *S. enteritidis* (combinação das duas Séries)**

<b>Temperatura</b>	<b><math>n</math></b>	<b><math>k</math></b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b><math>D \pm IC\ 95\%</math> (min)</b>
52°C	30	0,051	0,931	2,41	$45,2 \pm 5,0$
54°C	20	0,119	0,923	1,27	$19,3 \pm 2,7$
56°C	20	0,162	0,794	1,93	$14,2 \pm 4,1$
58°C	20	0,516	0,843	0,44	$4,46 \pm 0,92$
60°C	18	1,158	0,826	0,24	$1,99 \pm 0,50$
62°C	26	1,716	0,718	0,18	$1,34 \pm 0,37$
<b><math>z \pm IC\ 95\%</math> (°C)</b>	<b>6</b>	<b>0,159</b>	<b>0,982</b>	<b>0,42</b>	<b><math>6,27 \pm 1,16</math></b>

## 5. INACTIVAÇÃO TÉRMICA APÓS TRATAMENTOS DE ALTA PRESSÃO

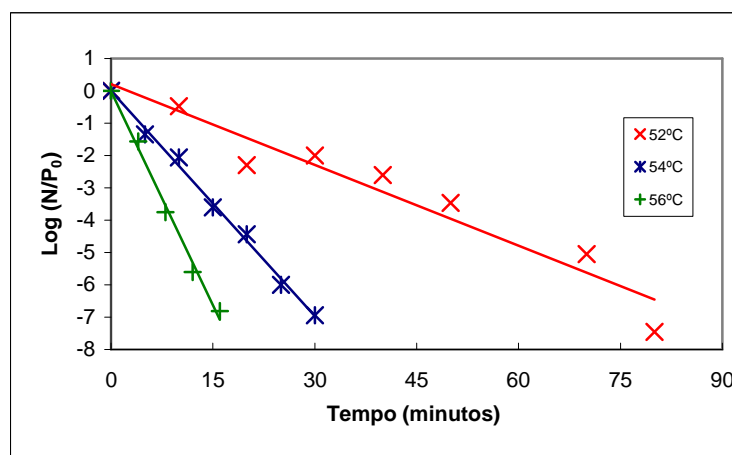
Os **Gráficos 5.1, 5.2 e 5.3**, apresentam as curvas de inativação térmica obtidas nas culturas previamente submetidas a 200 MPa à temperatura ambiente, durante 5', 15' e 30', respectivamente ( $P_0$  significa o número de ufc após os tratamentos de AP).

Os parâmetros cinéticos obtidos encontram-se na **Tabela 5.1**.



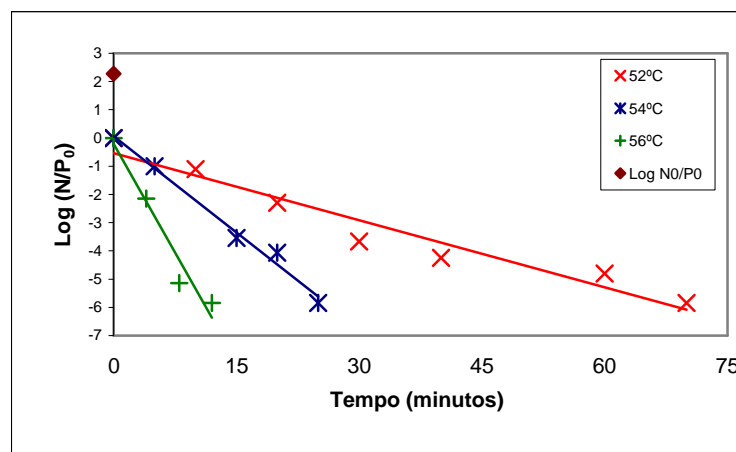
$N_0 = 5,0 \times 10^7 / 0,1 \text{ ml};$   $P_0 = 4,9 \times 10^7 / 0,1 \text{ ml}$

**Gráfico 5.1 – Curvas de inativação térmica de *S. enteritidis* submetida a 200 MPa durante 5 minutos**



$N_0 = 1,8 \times 10^8 / 0,1 \text{ ml};$   $P_0 = 2,0 \times 10^8 / 0,1 \text{ ml}$

**Gráfico 5.2 – Curvas de inativação térmica de *S. enteritidis* submetida a 200 MPa durante 15 minutos**



$N_0 = 1,31 \times 10^8 / 0,1 \text{ ml}$ ;  $P_0 = 6,95 \times 10^5 / 0,1 \text{ ml}$ ;  $\text{Log (N}_0 / P_0\text{)} = 2,3$

**Gráfico 5.3 – Curvas de inativação térmica de *S. enteritidis* submetida a 200 MPa durante 30 minutos**

**Tabela 5.1 – Inativação térmica de *S. enteritidis* submetida a 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos**

Temperatura	Tempo de Pressurização (minutos)	n	k	r <sup>2</sup>	Desvio Padrão	D ± IC 95% (minutos)
52°C	0 (Controlo)	6	0,051	0,919	7,67	45,0 ± 24,4
	5	18	0,086	0,957	1,55	26,6 ± 3,3
	15	16	0,166	0,894	1,50	13,8 ± 3,3
	30	14	0,172	0,914	1,55	13,4 ± 3,7
54°C	5	16	0,187	0,970	0,64	12,3 ± 1,42
	15	14	0,532	0,985	0,17	4,33 ± 0,39
	30	10	0,516	0,987	0,25	4,46 ± 0,70
56°C	0 (Controlo)	6	0,181	0,885	3,24	12,7 ± 13,9
	5	14	0,573	0,961	0,28	4,02 ± 0,66
	15	10	1,027	0,989	0,10	2,24 ± 0,27
	30	8	1,193	0,963	0,22	1,93 ± 0,69
<b>z ± IC 95% (°C)</b>	5	3	0,205	0,988	0,52	4,86 ± 6,63
	15	3	0,192	0,980	0,73	5,21 ± 9,25
	30	3	0,212	0,995	0,32	4,72 ± 4,05

Os controlos referidos na **Tabela 5.1** correspondem a repetições das inativações térmicas a 52°C e 56°C a partir da cultura não submetida a AP. Estes controlos foram realizados para despistar eventuais efeitos nos parâmetros cinéticos, provenientes da utilização de culturas preparadas em dias diferentes.

Como se pode observar, por comparação entre os valores apresentados na **Tabela 5.1** e na **Tabela 4.3**, para 52°C e 56°C, os factores **D** obtidos são semelhantes, indicando assim que os parâmetros cinéticos não variaram com a cultura utilizada. No caso da **Tabela 5.1**, os IC a 95% dos valores do factor **D** dos controlos são muito superiores, devido ao facto de estes ensaios terem sido realizados com apenas 3 pontos experimentais. Este procedimento foi adoptado com o intuito de reduzir o trabalho experimental, uma vez que se pretendia apenas despistar eventuais efeitos da preparação da cultura.

Da informação contida nos **Gráficos 5.1, 5.2 e 5.3** ressalta o efeito do tratamento de AP no número inicial de células: os tratamentos aplicados durante 5' e 15' não alteraram o  $N_0$ , ao contrário do tratamento durante 30', que causou 2,3 reduções decimais em  $N_0$ .

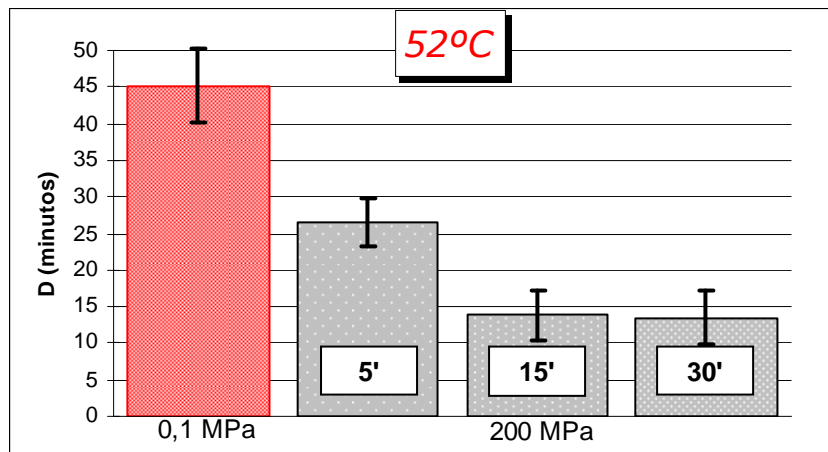
Como se pode constatar pelos dados apresentados na **Tabela 5.1**, por comparação com os da **Tabela 4.3**, os tratamentos de AP tornaram a cultura mais sensível ao efeito da temperatura.

Os valores para o factor **D** da cultura submetida a AP tiveram uma redução entre 14% e 64%, comparados com os valores da cultura não submetida a AP (**Tabela 5.2**).

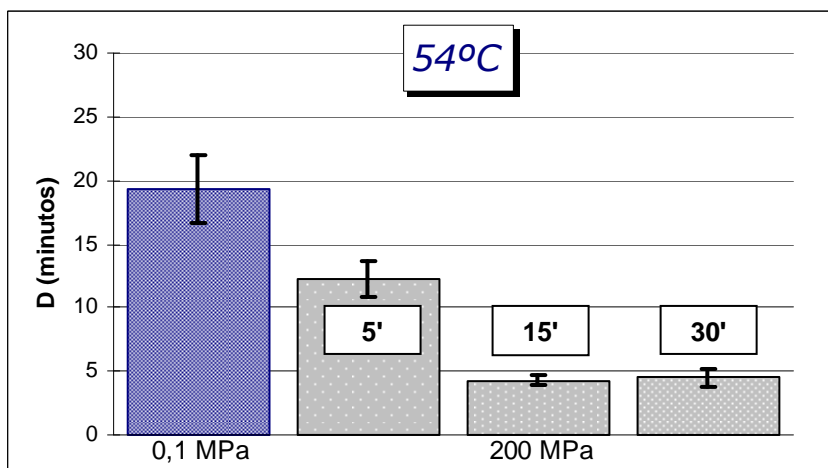
**Tabela 5.2 – Valor relativo (%) do factor *D* de *S. enteritidis*, após tratamentos de 200 MPa , comparado com o valor sem pressurização**

<b>Temperatura</b>	<b><i>D</i> ± IC 95% Sem Pressurização</b>	<b>AP 5'</b>	<b>AP 15'</b>	<b>AP 30'</b>
52°C	45,2 ± 5,0	59 %	31 %	30 %
54°C	19,3 ± 2,7	64 %	22 %	23 %
56°C	14,2 ± 4,1	28 %	16 %	14 %

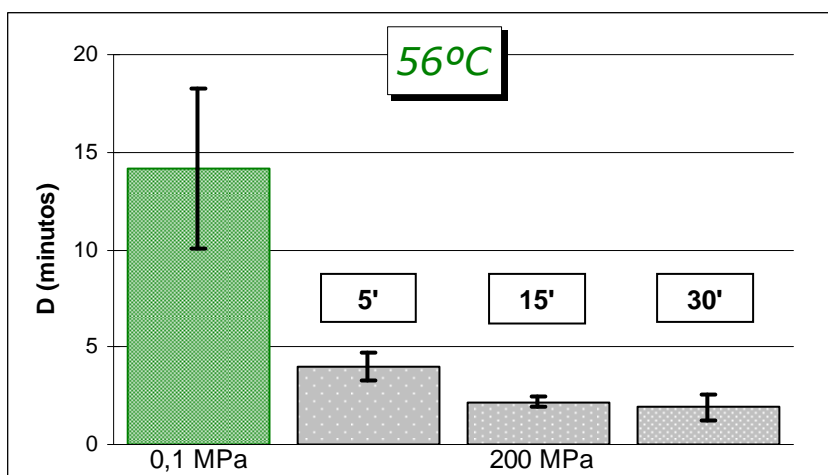
Os **Gráficos 5.4, 5.5 e 5.6** ilustram a variação do factor **D** segundo as condições dos tratamentos de AP (as barras de erro representam, uma vez mais, os IC a 95%). Os valores referentes ao tratamento térmico da cultura não submetida a AP são provenientes da **Tabela 4.3** (52°C, 54°C e 56°C), e os referentes aos vários tempos de pressurização são provenientes da **Tabela 5.1**.



**Gráfico 5.4 – Comparação do factor *D* de *S. enteritidis* a 52°C, antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos**



**Gráfico 5.5 – Comparação do factor *D* de *S. enteritidis* a 54°C, antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos**



**Gráfico 5.6 – Comparação do factor *D* de *S. enteritidis* a 56°C, antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos**

O valor do factor **D** da cultura submetida a AP foi sempre significativamente menor ( $p < 0,001$  para 52°C e 54°C, e  $p < 0,005$  para 56°C) quando comparado com o da cultura não submetida a AP.

No que respeita ao efeito do tempo de pressurização, o valor do factor **D** nos tratamentos de 15' e 30' foram significativamente menores ( $p < 0,02$ ) quando comparados com os tratamentos de 5', para todas as temperaturas; comparando 15' e 30' de pressurização, não se verificaram diferenças significativas.

Em termos práticos, isto significa que o interesse em aplicar a nível industrial tratamentos de 30', relativamente a 15', advém de uma redução de  $N_0$ , mas não existe efeito adicional na cinética de inactivação que não possa ser obtido com 15' de tratamento por AP.

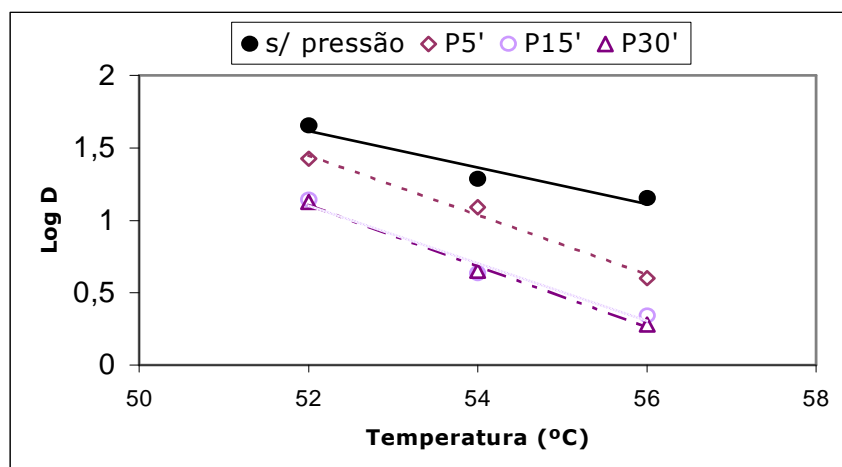
Os dados indicam que, apesar do tratamento de AP durante 30' ter causado uma redução de cerca de duas reduções decimais em  $N_0$ , as células sobreviventes terão sofrido o mesmo tipo, ou grau, de danos que para 15' de pressurização, dado que apresentaram valores para o factor **D** semelhantes.

Relativamente a 5' de pressurização, os resultados indicam que o tipo, ou grau, de danos sofridos deverá ter sido diferente, pois o valor de **D** foi significativamente maior ( $p < 0,02$ ), em todas as temperaturas de estudo, comparando com 15' e 30' de pressurização.

Quanto aos efeitos dos tratamentos de AP no factor **z**, em termos estatísticos não se pode inferir, devido ao facto de, com apenas três temperaturas, os valores dos IC a 5% de significância serem bastante elevados.

De qualquer modo, verificou-se para os três tempos de pressurização, uma tendência para um menor valor do factor **z** (dados das **Tabelas 5.1 e 4.3**).

As linearizações usadas são apresentadas no **Gráfico 5.7**, onde se pode constatar que os declives foram maiores (menor valor de **z**) nas culturas submetidas a AP.



**Gráfico 5.7 – Determinação do factor z de *S. enteritidis*, antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos**

Os resultados obtidos são bastante interessantes, dado revelarem que, com danos aparentemente letais e subletais (AP durante 30'), ou apenas subletais (AP durante 5' e 15'), a cultura ficou, após os tratamentos de AP, bastante mais sensível à inactivação pela temperatura.

Resultados semelhantes, embora de efeito menos significativo, foram obtidos por Linton *et al.* [1] para *E. coli* O157:H7. No caso do estudo de Ananta e Knorr [25] em *L. rhamnosus* GG, os tratamentos de AP tornaram o microrganismo mais resistente ao efeito da temperatura. Estes dois resultados diferentes poderão dever-se às características intrínsecas dos microrganismos envolvidos e/ou à especificidade das condições experimentais.

No caso da *S. enteritidis*, os resultados apurados neste trabalho abrem possibilidades interessantes para o processamento de alimentos em que a *Salmonella* constitua o microrganismo de referência para garantir a segurança microbiológica. Um grupo de alimentos em que se poderá potencialmente aplicar este tipo de processamento combinado será o dos ovos e ovoprodutos.

Neste tipo de alimentos, o processamento combinado sequencial (AP seguido de temperatura) poderá permitir reduzir significativamente o binómio tempo/temperatura, com ganhos na Qualidade do produto final e na redução dos custos energéticos.

Acresce ainda que a intensidade de pressão utilizada (200 MPa, 1974 Atm) é bastante baixa, quando comparada com aquelas utilizadas habitualmente na pasteurização de alimentos (450-500 MPa). Deste modo, o próprio equipamento necessário para processar alimentos a 200 MPa será bastante menos oneroso.

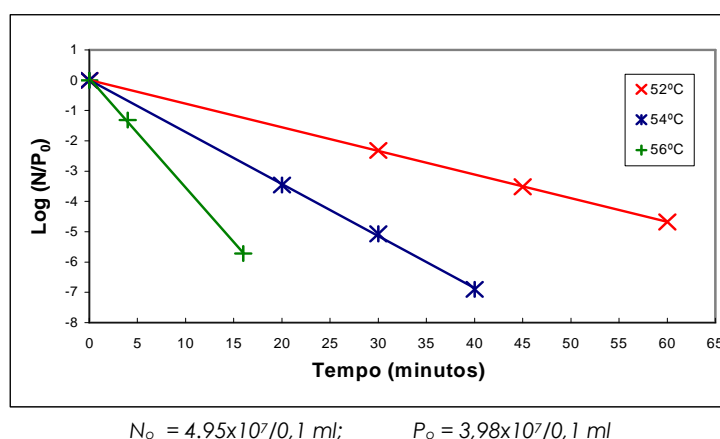
## 6. INACTIVAÇÃO TÉRMICA APÓS TRATAMENTOS DE ALTA PRESSÃO E CONSERVAÇÃO DURANTE 7 DIAS A 4°C

Com o intuito de aferir se a cultura recuperava dos danos causados pelos tratamentos de AP, amostras pressurizadas foram conservadas a 4°C durante 7 dias, após o que se repetiram os ensaios de inactivação térmica.

A temperatura de armazenamento após processamento por AP pode exercer influência na viabilidade das células, sendo que a refrigeração pode ser responsável por aumentar o tempo necessário à restauração das membranas afectadas [18].

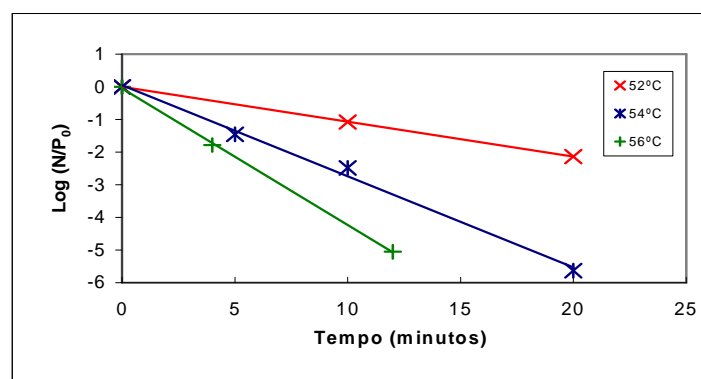
Linton *et al.* [1] referem que o armazenamento de *S. enteritidis* a 4°C pode aumentar inclusivamente a sua sensibilidade a tratamentos térmicos, pela diminuição da fluidez da membrana.

As curvas de inactivação térmica obtidas são apresentadas nos **Gráficos 6.1, 6.2 e 6.3**, e os parâmetros cinéticos na **Tabela 6.1**.



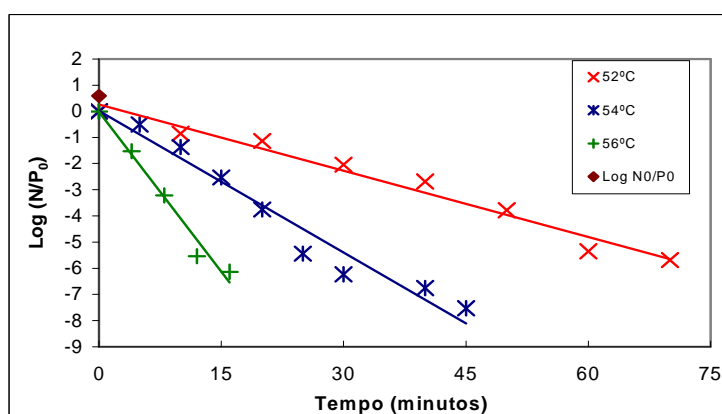
**Gráfico 6.1 – Curvas de inactivação térmica de *S. enteritidis* submetida a 200 MPa (5 minutos) e conservada 7 dias a 4°C**





$$N_0 = 1,8 \times 10^8 / 0,1 \text{ ml}; \quad P_0 = 0,33 \times 10^8 / 0,1 \text{ ml}$$

**Gráfico 6.2 – Curvas de inativação térmica de *S. enteritidis* submetida a 200 MPa (15 minutos) e conservada 7 dias a 4°C**



$$N_0 = 1,31 \times 10^8 / 0,1 \text{ ml}; \quad P_0 = 0,34 \times 10^8 / 0,1 \text{ ml}$$

**Gráfico 6.3 – Curvas de inativação térmica de *S. enteritidis* submetida a 200 MPa (30 minutos) e conservada 7 dias a 4°C**

Os ensaios com a cultura que havia sido processada a 200 MPa durante 5' e 15' foram realizados com muito menos pontos experimentais que a 30', pois apenas se pretendia aferir se ocorreria algum efeito da conservação a 4°C após 7 dias, não sendo este o objectivo principal deste trabalho.

A primeira observação a destacar dos resultados obtidos neste conjunto de ensaios relaciona-se com o facto de, no tratamento de 200 MPa durante 30', a cultura ter recuperado dos danos aparentemente letais sofridos, após os 7 dias de conservação a 4°C, i.e., o valor de  $P_0$  7 dias antes (**Gráfico 5.3**) era de  $6,95 \times 10^5 / 0,1 \text{ ml}$ , enquanto que neste ensaio, a partir da mesma amostra de cultura ( $N_0$  de  $1,31 \times 10^8 / 0,1 \text{ ml}$ ), o valor de  $P_0$  foi de  $0,34 \times 10^8 / 0,1 \text{ ml}$ . Isto significa que os danos aparentemente letais causados pela pressurização de 30' (cerca de 2 reduções decimais) foram de carácter

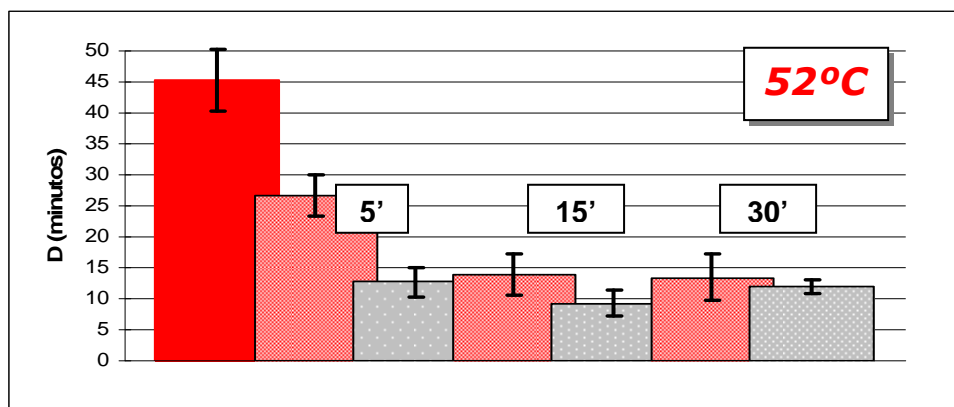
subletal, sendo que a conservação a 4°C permitiu a recuperação das células para valores próximos dos iniciais.

Para os tratamentos de 5' e 15', não se verificaram alterações significativas no valor de  $N_0$  pela conservação a 4°C, mas também não se tinham verificado reduções no número de células imediatamente após os tratamentos de AP.

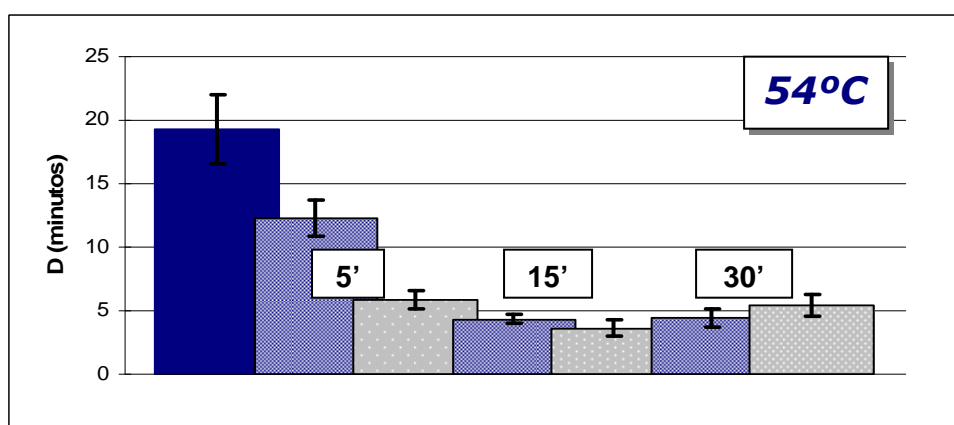
**Tabela 6.1 – Inativação térmica de *S. enteritidis* submetida a 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos, e conservada 7 dias a 4°C**

<b>Temperatura</b>	<b>Tempo de Pressurização (minutos)</b>	<b>n</b>	<b>k</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>D ± I.C.95% (minutos)</b>
52°C	5	8	0,181	0,990	0,72	12,7 ± 2,3
	15	6	0,248	0,985	0,64	9,28 ± 2,1
	30	16	0,194	0,968	0,55	11,9 ± 1,2
54°C	5	8	0,396	0,995	0,22	5,82 ± 0,70
	15	8	0,637	0,991	0,19	3,61 ± 0,62
	30	18	0,426	0,955	0,37	5,40 ± 0,82
56°C	5	6	0,849	0,975	0,22	2,71 ± 0,60
	15	6	0,946	0,998	0,06	2,43 ± 0,19
	30	10	0,940	0,984	0,14	2,45 ± 0,36
<b>z ± I.C.95% (°C)</b>	5	3	0,168	0,999	0,04	5,96 ± 0,45
	15	3	0,145	0,980	0,73	6,87 ± 20,6
	30	3	0,172	0,999	0,0004	5,83 ± 0,005

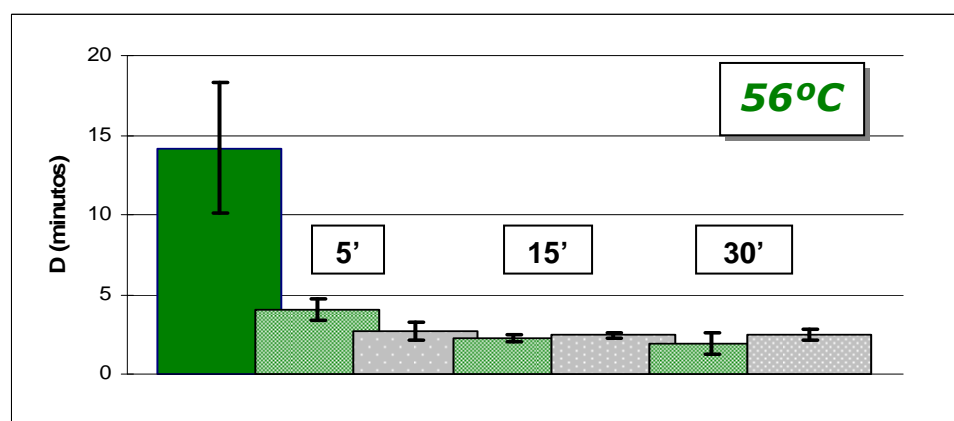
A segunda observação a destacar reside no facto de os valores para o factor **D** se terem mantido significativamente menores, quando comparados com aqueles obtidos para a cultura não submetida a AP (**Tabela 4.3**), para todas as temperaturas ( $p < 0,002$  para 52°C e 54°C, e  $p < 0,001$  para 56°C), e em todos os tempos de pressurização (**Gráficos 6.4, 6.5 e 6.6**). Relativamente ao efeito do tempo de pressurização, após 7 dias a 4°C, os valores do factor **D** e respectivos IC a 95% são mais semelhantes entre si, dado que o valor referente a 5' de pressurização diminuiu para cerca de metade ( $p < 0,05$  em todas as temperaturas); com essa excepção a 5', quando se compararam, para cada tempo de pressurização, os valores do factor **D** ao fim de 7 dias com aqueles obtidos imediatamente após AP (dados da **Tabela 5.1**), não se verificaram diferenças significativas. Deste modo, poder-se-á afirmar que, globalmente, o efeito dos tratamentos de AP na resistência térmica se manteve.



**Gráfico 6.4 – Comparação do factor *D* de *S. enteritidis* a 52°C, com e sem tratamentos de 200 MPa durante 5, 15 e 30 minutos**  
 ( ■ 0,1 MPa ■ 200 MPa ■ 200 MPa ao fim de 7 dias )

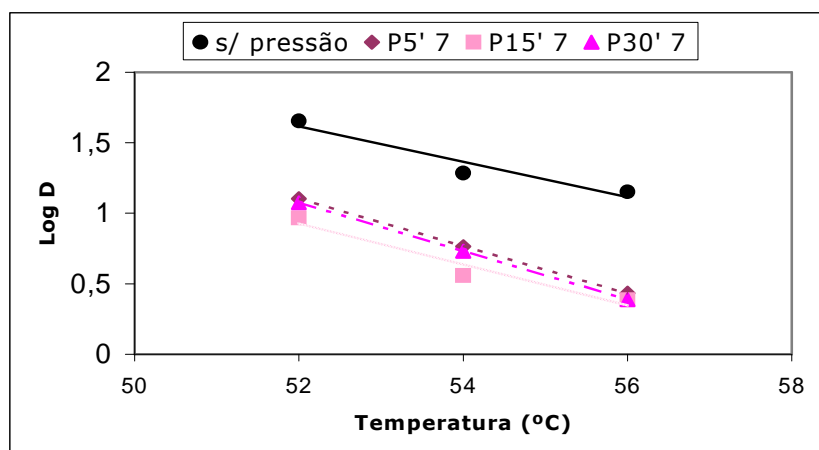


**Gráfico 6.5 – Comparação do factor *D* de *S. enteritidis* a 54°C, com e sem tratamentos de 200 MPa durante 5, 15 e 30 minutos**  
 ( ■ 0,1 MPa ■ 200 MPa ■ 200 MPa ao fim de 7 dias )



**Gráfico 6.6 – Comparação do factor *D* de *S. enteritidis* a 56°C, com e sem tratamentos de 200 MPa durante 5, 15 e 30 minutos**  
 ( ■ 0,1 MPa ■ 200 MPa ■ 200 MPa ao fim de 7 dias )

Os valores do factor **z** (**Gráfico 6.7**), apresentam uma tendência de aumento, aproximando-se dos valores obtidos com a cultura não submetida a AP (**Gráfico 5.7**), embora não se possam retirar conclusões, dado que apenas foram determinados os valores do factor **D** para três temperaturas. Uma segunda observação relaciona-se com o facto do valor do factor **z** entre os tipos de tratamento de AP aplicados (5',15' e 30') apresentar valores mais semelhantes entre si.



**Gráfico 6.7 – Determinação do factor z de *S. enteritidis*, antes e 7 dias após tratamento de 200 MPa, durante 5, 15 e 30 minutos**

## 7. EFEITO DO TRATAMENTO DE ALTA PRESSÃO A 300 MPa

Após a análise dos resultados do efeito obtido com tratamentos de AP a 200 MPa, considerou-se a possibilidade de repetição dos mesmos ensaios mas com processamento a uma intensidade de pressão superior.

O raciocínio subjacente a esta metodologia foi o de que talvez fosse possível obter o mesmo efeito de diminuição da resistência térmica da cultura a uma pressão superior, com tempos de processamento menores. Se assim ocorresse, este processamento sequencial poderia comportar óbvias vantagens numa aplicação industrial.

Contudo, conhecendo de trabalhos anteriores [108,110,111] o facto de que pressões relativamente baixas, dependendo do seu tempo de processamento, podem causar efeitos adversos na Qualidade do ovo – designadamente ao nível da cor e das propriedades reológicas, foi decidido efectuar um ensaio a 300 MPa à temperatura ambiente, com um tempo de processamento reduzido (5').

Uma vez que a prensa hidroestática utilizada nos ensaios de 200 MPa não permitia o emprego de pressões mais elevadas, utilizou-se uma segunda prensa hidroestática do Departamento de Cerâmica, descrita no Capítulo III.

Devido quer ao maior volume do vaso onde as amostras são processadas, quer às limitações da bomba da prensa, o tempo necessário para se atingir 300 MPa foi de aproximadamente 5'20" (**Tabela 7.1**).

**Tabela 7.1- Tratamento de Alta Pressão a 300 MPa**

<i>Come-up</i>	<i>Hold</i>	<i>Release</i>
5'20"	5'	1'

Nestas condições, torna-se evidente que, tendo sido o tempo de compressão praticamente igual ao tempo de pressão efectiva, aquele poderá ter tido influência significativa nos resultados obtidos.

Como já foi referido, as condições de processamento a 300 MPa poderão estar próximas das condições que podem alterar as características intrínsecas do ovo, pelo que, e para tirar proveito do maior volume do vaso de pressão desta prensa, o ensaio foi efectuado simultaneamente em meio de cultura e em ovo líquido inteiro (OLI) não inoculado.

Relativamente à amostra de células em meio de cultura ( $N_0 = 2,23 \times 10^8/0,1$  ml), verificou-se um  $P_0 = 2,12 \times 10^2/0,1$  ml, ou seja, o tratamento de Alta Pressão, por si só, originou 6 reduções decimais no número inicial de ufc, quando a 200 MPa durante os mesmos 5' não produziram qualquer efeito.

Estes resultados permitiram concluir que:

- a) este processamento por AP causou uma redução muito significativa no número inicial de células, podendo ser encarado, *de per se*, como um método para pasteurizar ovo;
- b) numa situação destas, não tem interesse prático efectuar um tratamento combinado sequencial, dado que o efeito principal na destruição de microrganismos advém do tratamento por pressão.

No entanto, o resultado acima descrito não foi conhecido imediatamente após o tratamento de pressão, mas apenas após diluições, sementeiras e contagens de ufc

em placa, pelo que foi efectuado o tratamento sequencial inicialmente previsto, a 52°C, 54°C e 56°C; contudo, nenhuma das placas de meio TSA semeadas após os ensaios de inactivação térmica apresentou crescimento, em qualquer dos tempos e diluições.

Estes resultados podem indicar que o tratamento a 300 MPa terá reduzido significativamente a resistência da cultura à inactivação térmica, uma vez que, mesmo com um  $P_0$  de  $2,12 \times 10^2/0,1$  ml, deveria ter-se verificado crescimento a temperaturas mais baixas (p.e., 52°C) e tempos de tratamento mais curtos (p.e., 5'), já que, considerando os resultados dos tratamentos a 200 MPa (**Gráficos 4.1 e 4.2**), ocorre uma redução decimal em  $N_0$  após cerca de 20' de inactivação a 52°C.

No caso do tratamento a 300 MPa e subsequente inactivação a 52°C, não se observou crescimento logo após 5', pelo que se deverá ter verificado um efeito uma redução de dois ciclos logarítmicos, efeito muito superior ao verificado a 200 MPa.

Relativamente à amostra de OLI não inoculado, o tratamento a 300 MPa causou alterações qualitativas visíveis, apresentando-se o OLI com uma cor amarelo sem brilho, ausência de aroma característico, e passagem para uma consistência claramente mais viscosa.

Efectuando-se um ensaio semi-quantitativo da viscosidade, observou-se que, enquanto uma amostra idêntica não submetida a AP levou 1' a escorrer por uma pipeta de 5 ml, a consistência da amostra do ensaio manifestou-se impossível de pipetar, revelando um claro aumento de viscosidade.

Com efeito, Lee *et al.* [111] refere 1'49'' como o tempo crítico de processamento a 300 Mpa a 25°C, após o qual ocorrem alterações estruturais em ovo (no caso do mesmo tratamento, mas a 5°C, o tempo crítico seria de 3'20'', e a 45°C originaria coagulação instantânea).

Deste modo, e face aos resultados obtidos, quer com a AP isolada, quer combinada sequencialmente com a temperatura, colocou-se de parte o desenvolvimento desta hipótese com vista à pasteurização de ovo, de onde resulta ainda maior pertinência e relevância para os resultados obtidos a 200 MPa.

No entanto, é de referir que nenhuma das prensas utilizadas permite o emprego de pressões entre 200 Mpa e 300 Mpa, pelo que, quando se dispuser de um aparelho de características que o permitam, se considera ser essa linha de investigação muito interessante para explorar em futuros trabalhos, designadamente com a combinação de menores tempos de processamento para a obtenção dos mesmos resultados.

## 8. INACTIVAÇÃO TÉRMICA EM OLI

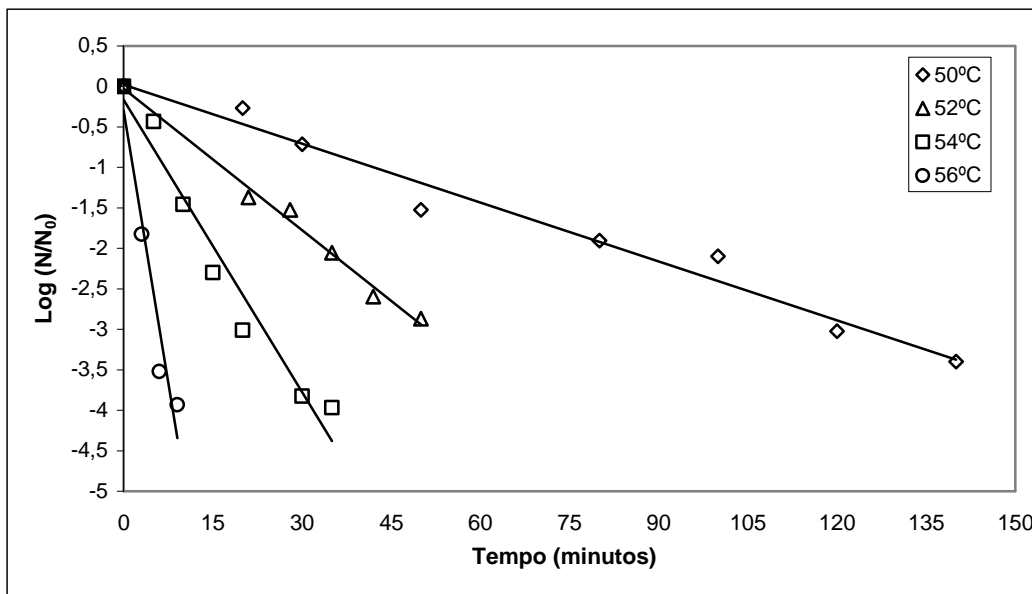
Uma amostra de ovo inteiro homogeneizado e inoculado com *S. enteritidis* foi submetida a inactivação térmica na gama de temperaturas previamente seleccionada (50°C, 52°C, 54°C e 56°C), cujos resultados são apresentados na **Tabela 8.1**, encontrando-se as curvas de inactivação no **Gráfico 8.1**, onde se verifica uma cinética de inactivação de primeira ordem, à semelhança da inactivação térmica da cultura em meio TSB.

**Tabela 8.1 – Inactivação térmica de *S. enteritidis* em OLI**

<b>Temperatura</b> ( $N_0 = 2,0 \times 10^6/0,1$ ml)	<b>n</b>	<b>k</b>	<b>r<sup>2</sup></b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>D ± IC 95%</b> (min)
50°C	16	0,055	0,936	3,62	41,6 ± 8,2
52°C	12	0,143	0,891	1,78	16,1 ± 4,0
54°C	14	0,287	0,945	0,58	8,03 ± 1,28
56°C	8	1,036	0,941	0,39	2,22 ± 1,69
<b>z ± IC 95% (°C)</b>	4	0,207	0,985	0,41	4,84 ± 1,76

Os resultados obtidos indicam que, em OLI, a *S. enteritidis* foi bastante menos resistente à inactivação térmica do que em meio TSB (**Tabela 4.3**), dado que os valores do factor **D** foram bastante menores (entre 2 a 7 vezes).

Este resultado pode ter-se devido a duas possibilidades: a primeira relaciona-se com o facto de o microrganismo ter sido incubado em meio TSB, inoculado em OLI e imediatamente a seguir submetido à inactivação térmica; assim, poderá ocorrer que a tentativa de rápida adaptação do microrganismo ao novo meio (OLI) o tenha tornado mais sensível ao efeito da temperatura.



**Gráfico 8.1 – Curvas de inativação térmica de *S. enteritidis* em OLI**

A segunda possibilidade está relacionada com o número inicial de células ( $N_0$ ): de acordo com a metodologia experimental seguida, com as suas limitações, o  $N_0$  do meio de cultura inicial foi de  $1,6 \times 10^8/0,1$  ml, enquanto que o  $N_0$  do OLI foi de  $2,0 \times 10^6/0,1$  ml, o que corresponde a menos dois ciclos logarítmicos. Esta questão foi estudada posteriormente neste trabalho, com inativações térmicas em OLI utilizando amostras com diferentes valores de  $N_0$ , apresentando-se os resultados mais à frente neste Capítulo, onde se discutirá, com maior pormenor, o efeito do valor de  $N_0$  na resistência à inativação térmica.

Relativamente ao factor **z**, este foi igualmente menor do que o verificado na inativação térmica em meio TSB, embora não se possam retirar conclusões em termos de significância estatística.

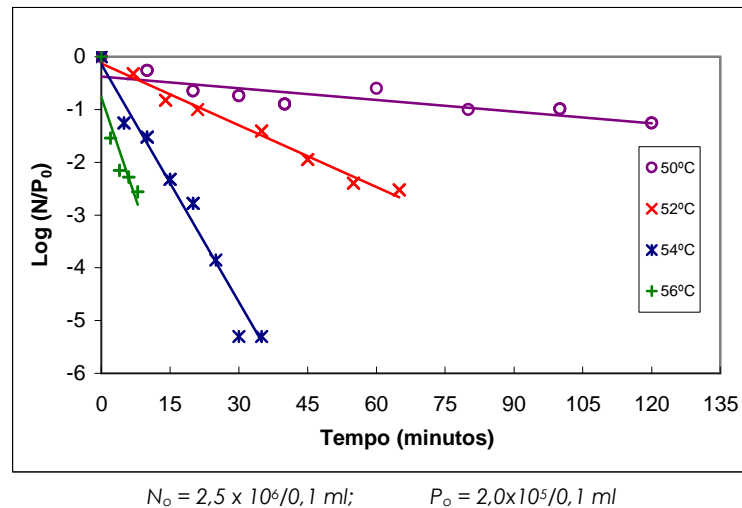
## 9. INATIVAÇÃO TÉRMICA APÓS TRATAMENTOS DE ALTA PRESSÃO (OLI)

As curvas de inativação térmica e os parâmetros cinéticos obtidos em cultura inoculada em OLI, previamente submetida a 200 MPa, são apresentados, respectivamente, nos **Gráficos 9.1 e 9.2**, e na **Tabela 9.1**.

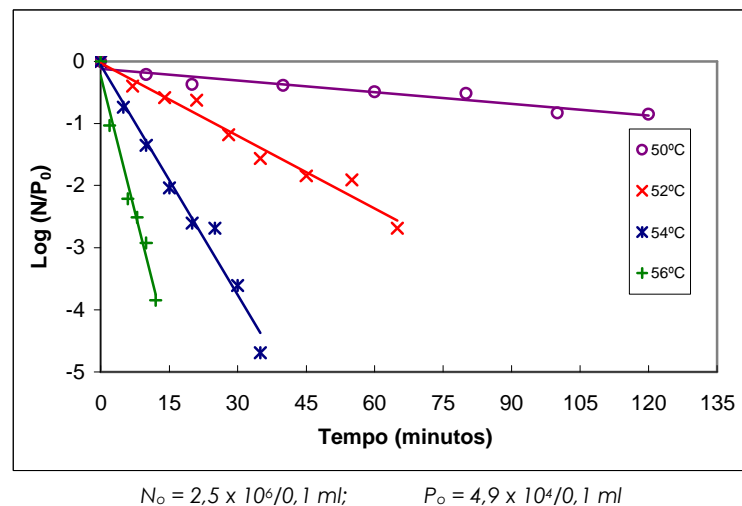
Em OLI, apenas se testou o efeito do tratamento de AP durante 15' e 30', uma vez que, de acordo com os resultados obtidos em meio TSB, foi com estes tempos que se



obtiveram os efeitos mais significativos na diminuição da resistência térmica da *S. enteritidis*.



**Gráfico 9.1 – Curvas de inativação térmica de *S. enteritidis* em OLI submetida a 200 MPa durante 15 minutos**

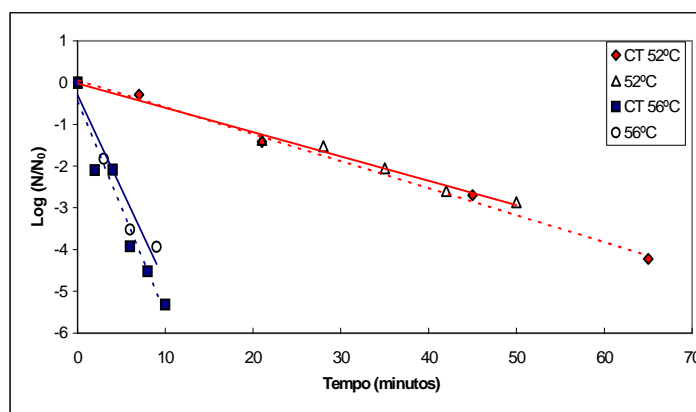


**Gráfico 9.2 – Curvas de inativação térmica de *S. enteritidis* em OLI submetida a 200 MPa durante 30 minutos**

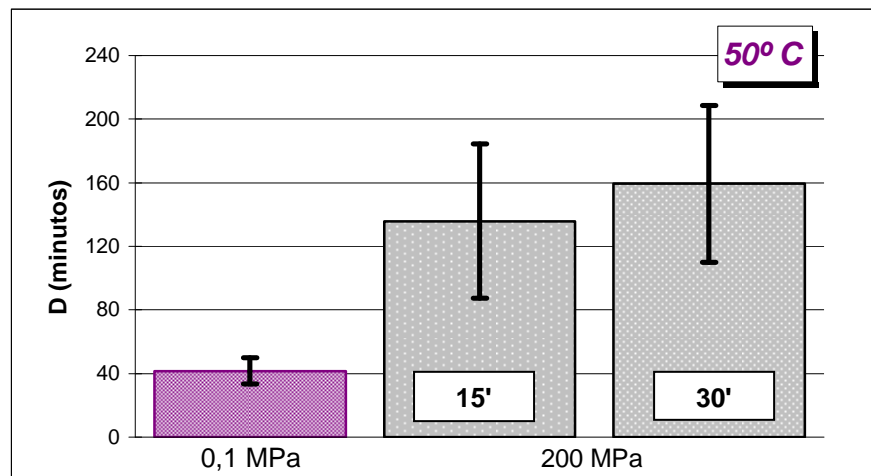
**Tabela 9.1 – Inactivação térmica de *S. enteritidis* em OLI,  
submetida a 200 MPa, durante 15 e 30 minutos**

<i>Temperatura</i>	<i>Tempo de Pressurização (minutos)</i>	<i>n</i>	<i>k</i>	<i>r</i> <sup>2</sup>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>D ± IC 95% (minutos)</i>
50°C	15	18	0,017	0,718	22,7	135,9 ± 48,7
	30	16	0,014	0,912	20,1	159,4 ± 49,3
52°C	0 (Controlo)	10	0,149	0,995	0,62	15,5 ± 2,0
	15	16	0,090	0,983	0,97	25,7 ± 2,1
	30	18	0,087	0,960	1,39	26,4 ± 3,0
54°C	15	16	0,345	0,962	0,42	6,68 ± 0,93
	30	16	0,277	0,962	0,47	8,32 ± 1,03
56°C	0 (Controlo)	12	1,209	0,917	0,23	1,90 ± 0,57
	15	10	0,587	0,782	0,78	3,93 ± 1,85
	30	12	0,660	0,963	0,26	3,49 ± 0,60
<b><i>z ± IC 95% (°C)</i></b>	15	4	0,260	0,955	0,59	3,84 ± 2,53
	30	4	0,274	0,972	0,43	3,65 ± 1,86

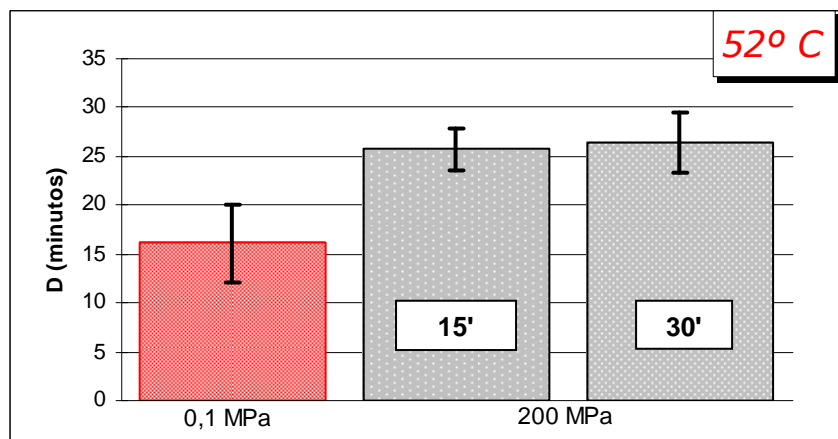
Na **Tabela 9.1**, os valores dos controlos apresentados referem-se a dois ensaios de inactivação térmica efectuados a partir da mesma amostra submetida a AP, e cujos valores para o factor ***D*** não foram diferentes ( $p>0,05$ ) dos obtidos anteriormente (**Tabela 8.1**). O **Gráfico 9.3** apresenta ambas as curvas de inactivação térmica, onde se verifica que não ocorreu nenhum efeito na resistência à inactivação térmica pelo facto de o meio ser constituído por lotes diferentes de ovos inteiros.



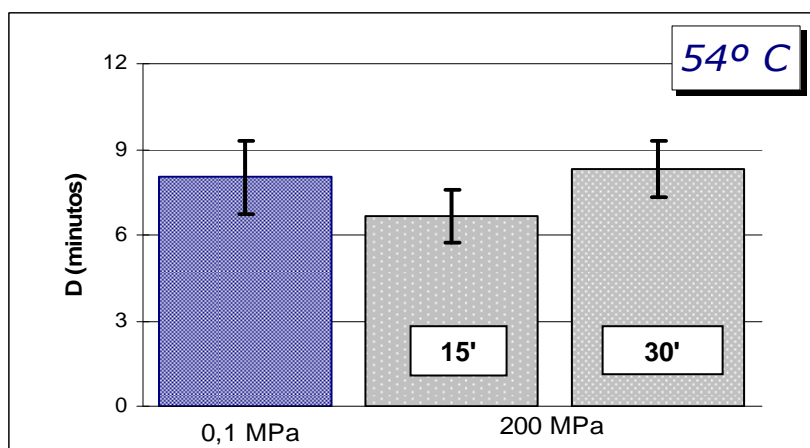
**Gráfico 9.3 – Curvas de inactivação térmica de *S. enteritidis* em OLI e dos controlos apresentados na  
Tabela 9.1**



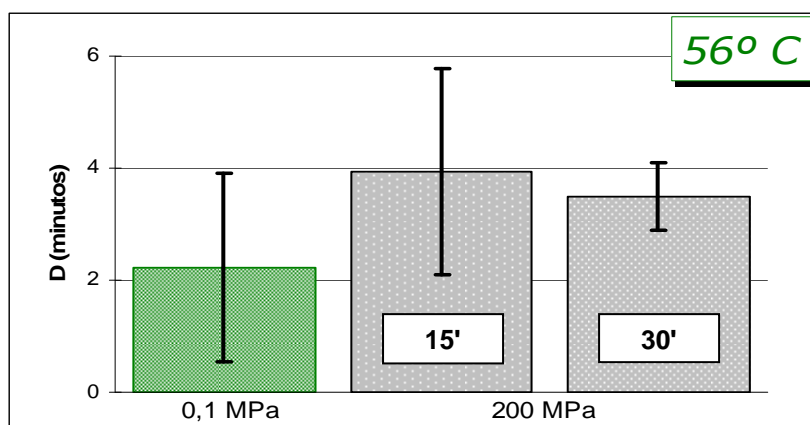
**Gráfico 9.4 – Comparação do factor *D* de *S. enteritidis* em OLI a 50°C, antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 15 e 30 minutos**



**Gráfico 9.5 – Comparação do factor *D* de *S. enteritidis* em OLI a 52°C, antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 15 e 30 minutos**



**Gráfico 9.6 – Comparação do factor *D* de *S. enteritidis* em OLI a 54°C, antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 15 e 30 minutos**



**Gráfico 9.7 – Comparação do factor *D* de *S. enteritidis* em OLI a 56°C, antes e após tratamentos de 200 MPa, durante 15 e 30 minutos**

Os **Gráficos 9.4, 9.5, 9.6 e 9.7** apresentam a comparação do factor ***D*** entre a cultura em OLI submetida a AP (dados da **Tabela 9.1**) e a cultura em OLI não submetida a AP (dados da **Tabela 8.1**).

Verificou-se que, a 50°C e a 52°C, o valor do factor ***D*** da cultura submetida aos tratamentos de AP foi significativamente maior ( $p < 0,001$ ) que os obtidos sem tratamentos de AP. A 54°C e a 56°C, os tratamentos de AP não causaram nenhum efeito significativo no valor do factor ***D*** ( $p > 0,05$ ).

Esta diferença de resultados entre as temperaturas deve-se ao facto de o factor ***z*** ser menor para a cultura submetida a AP (3,84°C e 3,65°C, respectivamente para 15' e 30') do que para a cultura sem tratamento de AP (4,84°C). Isto faz com que, para as temperaturas inferiores, o factor ***D*** seja maior no caso em que foi submetida a AP, enquanto que para as temperaturas superiores se aproximem os valores, devido à maior sensibilidade à variação da temperatura (menor valor de ***z***).

Comparando estatisticamente os dois tempos de pressurização (15' e 30'), verificou-se que não existiram diferenças para o factor ***D*** ( $p > 0,05$ ). O factor ***z*** apresentou valores muito semelhantes para os dois tempos de tratamento, e cerca de 1°C menor que o valor obtido sem AP.

Deste modo, verificou-se que, em OLI, os tratamentos de AP tiveram um efeito diferente na resistência da *S. enteritidis* à inactivação térmica, comparando com o efeito anteriormente obtido em meio de cultura. No caso do OLI, os tratamentos a 200

MPa aumentaram a resistência à inactivação térmica (maior valor de **D**) para 50°C e 52°C, e não tiveram efeito para 54°C e 56°C.

O diferente efeito dos tratamentos de 200 MPa em OLI e em meio TSB pode dever-se a duas razões. A primeira relaciona-se com o facto do meio ser diferente: à semelhança do que se verificou nos ensaios de inactivação térmica (subcapítulo 8), o facto de o microrganismo estar em adaptação a uma complexa matriz alimentar, que contém simultaneamente factores favoráveis e desfavoráveis ao seu crescimento, poderá influenciar o efeito que a AP exerce sobre a resistência à inactivação térmica.

Contudo, para a cultura em OLI submetida a AP, a resistência à inactivação térmica manteve-se (54°C e 56°C) ou aumentou (50°C e 52°C). Como se observou anteriormente (subcapítulo 8), no caso da cultura em OLI não submetida a AP, a sua resistência à inactivação térmica foi claramente menor em todas as temperaturas, comparada com a inactivação em meio TSB. Assim, o conjunto dos resultados indica que poderá não ser apenas o meio diferente (TSB ou OLI) a justificação para as diferenças observadas.

Uma segunda possibilidade relaciona-se com o número inicial de células antes dos ensaios de inactivação térmica. Para a inactivação térmica da cultura em OLI, verificou-se que o tratamento de AP durante 15' causou uma redução de 1 ciclo logarítmico em  $N_0$ , e o de 30' causou uma redução de cerca de 2 ciclos logarítmicos (**Gráficos 9.1 e 9.2**). Na cultura em meio TSB, 15' de pressurização não originaram nenhuma variação em  $N_0$ , e 30' causaram igualmente uma redução de cerca de 2 ciclos logarítmicos (**Gráficos 5.2 e 5.3**).

O meio diferente poderá não explicar todos os resultados obtidos, pelo que se coloca a hipótese de ambos os factores (meio e  $N_0$ ) serem responsáveis pelos resultados em OLI. Esta possibilidade é suportada pelos dados dos tratamentos de AP em meio TSB: de 5' para 15', ocorreu um claro efeito do tempo de processamento no factor **D**, enquanto que entre 15' e 30' os valores foram semelhantes, possivelmente devido a que, para 30', o tratamento de AP causou então uma redução de cerca de 2 reduções decimais em  $N_0$ . Assim, este último resultado, analisado sob este ponto de vista, parece indicar que um menor  $N_0$  causará um aumento do valor do factor **D**, enquanto que a matriz alimentar em causa poderá exercer um efeito de sinal contrário.

No subcapítulo seguinte são apresentados os resultados de um ensaio em que se variou o  $N_0$  e se verificou o seu contributo, no sentido de tentar esclarecer esta questão.

## 10. EFEITO DO NÚMERO INICIAL DE CÉLULAS NA INACTIVAÇÃO TÉRMICA EM OLI

Com o objectivo de avaliar o efeito do  $N_0$  na resistência à inactivação térmica em OLI, efectuou-se um ensaio de inactivação térmica em OLI, inoculando-o com uma cultura inicial próxima de  $10^4$  ufc/0,1 ml, i.e., menos dois ciclos logarítmicos relativamente ao  $N_0$  dos ensaios constantes na **Tabela 8.1**, valor este com a mesma ordem de grandeza do  $P_0$  do tratamento de 200 Mpa em OLI durante 30'.

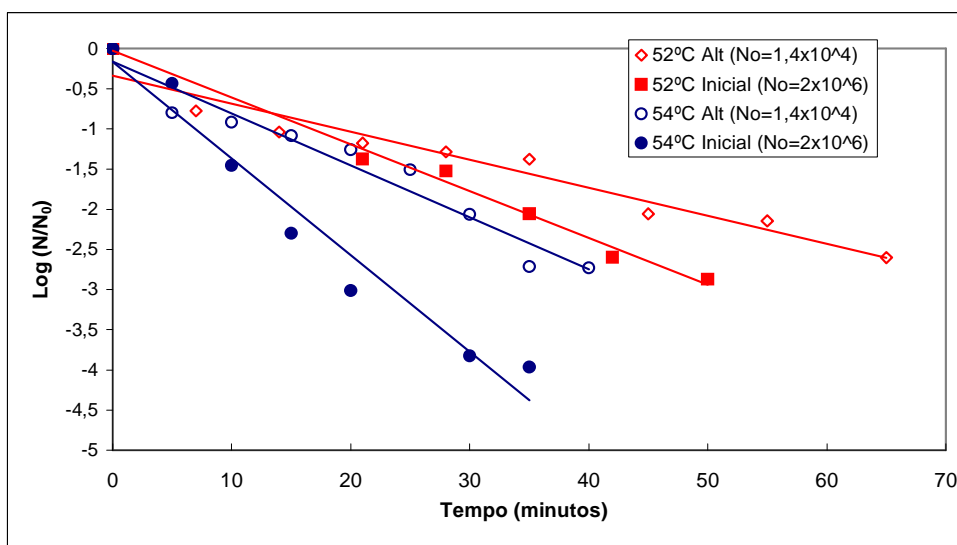
As curvas de inactivação térmica são apresentadas no **Gráfico 10.1** e os parâmetros cinéticos na **Tabela 10.1**. Em ambos os casos, apresenta-se igualmente os resultados correspondentes da **Tabela 8.1**, para facilitar a comparação. Os valores do factor **D** são comparados graficamente nos **Gráficos 10.2** e **10.3**.

**Tabela 10.1 – Inactivação térmica de *S. enteritidis* em OLI  
com diferentes valores de  $N_0$**

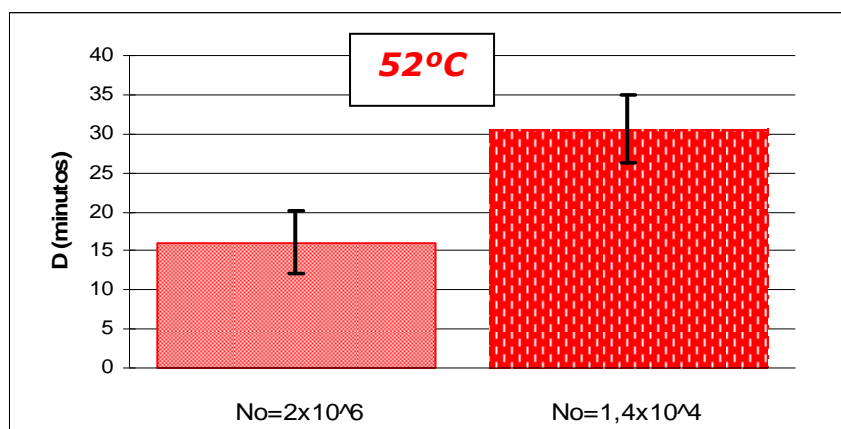
<b>Temperatura</b>	<b>Valor de <math>N_0</math> (ufc/0,1 ml)</b>	<b>n</b>	<b>k</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b><math>D \pm IC\ 95\%</math> (minutos)</b>
52°C	$2,0 \times 10^6$	12	0,143	0,891	1,78	$16,1 \pm 4,0$
	$1,4 \times 10^4$	18	0,075	0,929	2,06	$30,7 \pm 4,3$
54°C	$2,0 \times 10^6$	14	0,287	0,945	0,58	$8,03 \pm 1,28$
	$1,4 \times 10^4$	18	0,142	0,896	1,33	$16,2 \pm 2,81$

Verificou-se que um menor  $N_0$  originou maiores valores do factor **D** (sensivelmente o dobro), o que demonstra que um menor número inicial de células aumentou a resistência à inactivação térmica de *S. enteritidis*. Tanto a 52°C como a 54°C, este aumento do valor de **D** foi estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ).

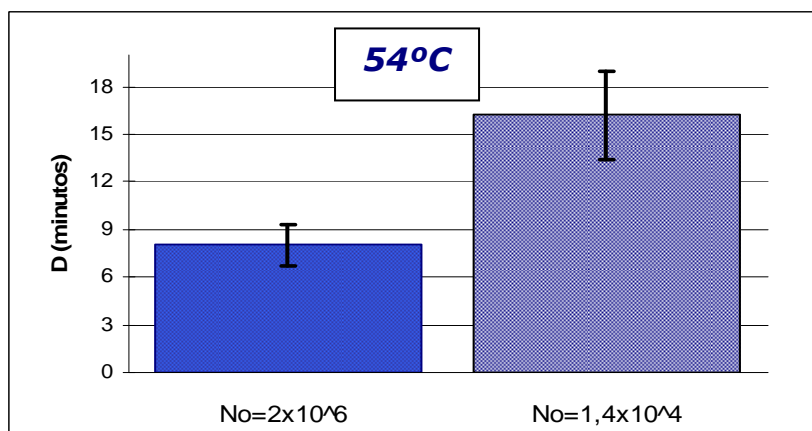
Os resultados indicam assim que, enquanto o efeito combinado de redução do  $N_0$  e da transição do meio de cultura para o OLI se traduz numa clara redução da resistência à inactivação térmica (**Tabela 8.1**), numa mesma matriz (OLI), uma redução do  $N_0$  tem um efeito contrário.



**Gráfico 10.1 - Curvas de inativação térmica de *S. enteritidis* em OLI com diferentes valores de  $N_0$**



**Gráfico 10.2 - Comparação do factor  $D$  de *S. enteritidis* em OLI a 52°C, com diferentes valores de  $N_0$**



**Gráfico 10.3 - Comparação do factor  $D$  de *S. enteritidis* em OLI a 54°C, com diferentes valores de  $N_0$**

Analisando novamente a **Tabela 5.1**, pode-se verificar que o tratamento de 200 MPa durante 15' de uma cultura inoculada em meio TSB, comparado com o tratamento de 5', causou uma diminuição do valor de **D** para cerca de metade (52°C e 56°C) e para cerca de um terço (54°C). Por outro lado, pelos resultados da **Tabela 10.1**, em cultura inoculada em OLI, uma redução de 2 ciclos logarítmicos em  $N_0$  causou um aumento para o dobro do valor do factor **D**.

Seria expectável que o tratamento de 200 Mpa durante 30' em TSB (**Tabela 5.1**) originasse uma nova redução do factor **D** no subsequente tratamento térmico; porém, tal não se verificou, tendo-se mantido constante, relativamente ao tratamento durante 15'. Se considerarmos que o efeito em OLI registado na **Tabela 10.1** se poderá verificar igualmente em meio TSB, então no caso do tratamento de 200 MPa durante 30' em TSB, em que ocorreram duas reduções decimais em  $N_0$ , poderá também ter existido um aumento para cerca do dobro do valor do factor **D**.

Assim, é plausível admitir que o tratamento de AP durante 30' poderá, de facto, diminuir o valor do factor **D**, pela mesma ordem de grandeza (entre metade a um terço) quando comparado com o tratamento durante 15', mas este efeito poderá ser contrariado por um efeito de natureza contrária e da mesma ordem de grandeza, causado pela diminuição de  $N_0$ , levando à ausência de variação no valor de **D** na inactivação térmica subsequente aos tratamentos de 15' e 30'.

Partindo desta possibilidade, se forem comparados os resultados em OLI a 52°C e 54°C, com e sem tratamento de AP, para um valor de semelhante de  $N_0$  antes da inactivação térmica (**Tabela 10.2**), verificamos que:

- a) a 52°C, o valor do factor **D** é maior em cerca de 5' relativamente aos tratamentos de 200 Mpa durante 15' e 30', numa tendência não significativa;
- b) a 54°C, o valor do factor **D** é aproximadamente o dobro do obtido nos tratamentos de 200 Mpa durante 15' e 30' ( $p < 0,001$ );

Deste modo, considerando a mesma matriz (OLI), e neutralizando na medida do possível o efeito do  $N_0$ , verifica-se que, relativamente a um tratamento térmico isolado, os tratamentos de AP durante 15' e 30', causam uma diminuição significativa do factor **D**, a 54°C, e uma tendência para uma diminuição a 52°C. O menor efeito verificado a 52°C poderá dever-se ao facto dos danos provocados pela AP não serem suficientes para alterar a resistência térmica a uma temperatura mais baixa.



**Tabela 10.2 –Inativação térmica de *S. enteritidis*  
em OLI a partir de valores de  $N_0$  semelhantes**

<b>Temperatura</b>	<b>Valor de <math>N_0</math> (ufc/ 0,1 ml)</b>	<b>Tempo de Pressurização (minutos)</b>	<b>Valor de <math>P_0</math> (ufc/ 0,1 ml)</b>	<b>n</b>	<b>k</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b><math>D \pm IC\ 95\%</math> (minutos)</b>
52°C	1,4x10 <sup>4</sup>	0 a)	-	18	0,075	0,929	2,06	30,7 ± 4,3
	-	15 b)	2,0x10 <sup>5</sup>	16	0,090	0,983	0,97	25,7 ± 2,1
	-	30 b)	4,9x10 <sup>4</sup>	18	0,087	0,960	1,39	26,4 ± 3,0
54°C	1,4x10 <sup>4</sup>	0 a)	-	18	0,142	0,896	1,33	16,2 ± 2,81
	-	15 b)	2,0x10 <sup>5</sup>	16	0,345	0,962	0,42	6,68 ± 0,93
	-	30 b)	4,9x10 <sup>4</sup>	16	0,277	0,962	0,47	8,32 ± 1,03

a) dados da **Tabela 10.1**

b) dados dos **Gráficos 9.1 e 9.2** e da **Tabela 10.1**

No caso da inativação térmica em meio TSB, e de acordo com a discussão já apresentada, deve considerar-se a hipótese do tratamento de 200 Mpa durante 30' causar igualmente uma diminuição significativa do factor ***D***, se for considerado o mesmo número inicial de microrganismos.

Assim, este trabalho deixa aberta a possibilidade para a prossecução dos estudos acerca das potencialidades de emprego do tratamento combinado sequencial com este microrganismo em OLI, designadamente quer ao nível da caracterização dos danos celulares provocados por tratamentos de AP, tanto em meio de cultura como em OLI, quer ao nível da sua correlação com os efeitos de resistência à inativação térmica verificados pela diminuição do número inicial de células, quer ainda relativamente à capacidade de recuperação desses efeitos. Uma aplicação prática deste tipo de processamento carece ainda de um conhecimento mais aprofundado das origens dos parâmetros cinéticos observados, para que as mais eficazes, seguras e simultaneamente rentáveis combinações de tempo, temperatura e AP possam ser desenvolvidas.

## V- CONCLUSÕES

A produção industrial de alimentos, e a sua conservação e preservação, constitui sempre o melhor compromisso possível entre os requisitos de Saúde Pública ao nível da segurança alimentar, o enquadramento jurídico, a viabilidade económica, e ainda as expectativas do consumidor no que concerne a um vasto conjunto de características do produto final.

Todos estes factores são de fulcral importância, não podendo o peso de um só invalidar o de qualquer outro ou, parafraseando a expressão favorita de um antigo Professor de Microbiologia, adquirida no seu trabalho de campo com nativos Mexicanos, *"There must be some food left !"*.

Novas tecnologias de processamento de alimentos têm vindo a redefinir e estender os limites do compromisso, e o processamento por AP apresenta-se como a tecnologia potencialmente mais promissora para iniciar uma nova era de produção de alimentos em escala.

Como contributo para a viabilidade da sua expansão, este estudo mostrou que:

- a) a resistência térmica de uma estirpe de *S. enteritidis* em meio de cultura diminuiu significativamente, quando previamente submetida a tratamentos de AP de nível subletal (200 MPa);
- b) os efeitos no tratamento sequencial foram visíveis, quer perante cinéticas de inactivação de tratamento térmico isolado, quer perante os controlos dos tratamentos de AP;
- c) o efeito de 200 MPa durante 15' na cinética de inactivação térmica foi maior que o efeito de 200 MPa durante 5';
- d) 200 MPa durante 30' geraram, por si só, uma redução no número inicial de células, mas, relativamente a 200 MPa durante 15', não aumentaram a velocidade de morte dos sobreviventes;
- e) os efeitos da AP foram observáveis ao fim de sete dias de conservação a 4°C, embora com recuperação dos danos sofridos a 200 MPa durante 30';
- f) em OLI, a matriz acentuou a velocidade de morte celular, enquanto que o menor número de células inicial constituiu um factor de resistência ao tratamento térmico;

- g) em OLI, quando comparados os comportamentos de duas populações da mesma ordem de grandeza, tratamentos de 200 MPa durante 15' e 30' provocaram uma diminuição da resistência térmica, significativa a 54°C e tendencial a 52°C

Tendo em conta que este estudo se baseou num desenho experimental original de tratamento combinado sequencial para este microrganismo, e a necessidade actual em continuar a contribuir para a elaboração de parâmetros (técnicos e económicos) de processamento em escala, consideram-se como pertinentes aferições futuras nesta temática, designadamente:

- a) caracterização do tipo de danos celulares observados;
- b) determinação da capacidade de recuperação dos efeitos da AP;
- c) caracterização do efeito da redução do número inicial de células (os testes laboratoriais são conduzidos com concentrações microbianas muito maiores que as que realmente ocorrem em alimentos - p.e., o número habitual de *Salmonella* spp é inferior a 20 células por ovo [73]);
- d) avaliação de efeitos em combinações sequenciais numa gama intermédia de AP (entre 200 e 300 MPa);
- e) avaliação de efeitos na mesma combinação sequencial, mas com AP dinâmica;
- f) caracterização do efeito dos tratamentos sequenciais nas propriedades reológicas e funcionais do OLI.

## BIBLIOGRAFIA

- 1- Linton M, McClements MJ, Patterson MF: The Combined Effect of High Pressure and Storage on the Heat Sensivity of *Escherichia coli* O157:H7. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2000, 1:31-37
- 2- Masschalsk B, Houdt RV, Haver EGRV, Michiels CW: Inactivation of Gram-negative Bacteria by Lysozyme, Denaturated Lysozyme, and Lysozyme-Derived Peptides under High Hydrostatic Pressure. Appl Environ Microbiol 2001, 67(1):339-344
- 3- Gould GW, in Barbosa-Cánovas GV, Gould GW: Food Preservation Technology Series - Innovations in Food Processing. Technomic 2000, Cap 1:1-12
- 4- Palou E, Lopez-Malo A, Barbosa-Cánovas GV, Swanson BG: High-Pressure Treatment in Food Preservation. Handbook of Food Preservation, Ed. M Shafir Rahman. Marcel Dekker, 1999, Cap 19:533-570
- 5- Ross A, Griffiths M, Mittal G, Deeth H: Combining Nonthermal Technologies to Control Foodborne Microorganisms. Int J Food Microbiol 2003, 89:125-138
- 6- Institute of Food Technologists: Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods. Report of the IFT for the Food and Drug Administration of the US Department of Health and Human Services, December 2001, in [http://www.foodprotect.org/pdf/hazard\\_foods/chapter5.pdf](http://www.foodprotect.org/pdf/hazard_foods/chapter5.pdf), acedido a 2 de Janeiro de 2005
- 7- Tewari G, Jayas DS, Holley RA: High Pressure Processing of Foods - An Overview (first published in Science des Aliments, 1999 (19):619-661), in <http://www.fresherunderpressure.com/science/hpp/review.htm>, acedido a 5 de Julho de 2004
- 8- Lanciotti R, Vannini L, Pittia P, Guerzoni ME: Suitability of High-dynamic-pressure-treated Milk for the Production of Yoghurt. Food Microbiol 2004, Vol 21:753-760
- 9- Torres JÁ, Velazquez G: Commercial Opportunities and Research Challenges in the High Pressure Processing of Foods. J Food Engin 2005, 67:95-112
- 10- Yuste J, Pla R, Capellas M, Ponce E, Mor-Mur M: High Pressure Processing Applied to Cooked Sausages: Bacterial Populations During Chilled Storage. J Food Prot 2000, 63:1093-1099
- 11- Directiva 1999/3/EC do Parlamento Europeu e do Concelho Europeu de 22 de Fevereiro, que estabelece o directório de alimentos e ingredientes tratados com Radiação Ionizante
- 12- Stabel JR: Effective Methods for Postharvest Intervention in Dairy Processing. J Dairy Sci 2003, 86(E.Suppl.):E10-E15

- 13-Knorr D: Novel Approaches in Food-processing Technology - New Technologies for Preserving Foods and Modifying Function. *Current Opinion in Biotechnology* 1999, 10:485-491
- 14-Shearer AE, Dunne CP, Sikes A, Hoover DG: Bacterial Spore Inhibition and Inactivation in Foods by Pressure, Chemical Preservatives and Mild Heat. *J Food Prot* 2000, 63:1503-1510
- 15-İbanoglu E, Karataş Ş: High Pressure Effect on Foaming Behavior of Whey Protein Isolate. *J Food Engin* 2001, 47:31-36
- 16-Ngarize S, Adams A, Howell N: A Comparative Study of Heat and High Pressure Induced Gels of Whey and Egg Albumen and their Binary Mixtures. *Food Hydrocolloids* 2005, 19(3):984-996
- 17-Hendrickx M, Ludikhuyze L, Broeck IV, Weemaes C: Effects of High Pressure on Enzymes Related to Food Quality. *Trends in Food Science & Technology* 1998, 9:197-203
- 18-US Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition: Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies - High Pressure Processing. 2000, *in* <http://vm.cfsan.fda.gov>, acedido a 27 de Abril de 2004
- 19-Ludikhuyse L et al, *in*: Thermal Technologies in Food Processing, Ed. Richardson P. CRC Press Boca Raton, 2001, Cap 14
- 20-Metrick C, Hoover DG, Farkas DF: Effects of High Hydrostatic Pressure on Heat-resistant and Heat-sensitive Strains of *Salmonella*. *J Food Sci*, 1989, 54(6):1547-49
- 21-Sancho F, Lambert Y, Demazeau G, Largeteau A, Bouvier JM, Narbonne JF: Effect of Ultra-high Hydrostatic Pressure on Hydrosoluble Vitamins. *J Food Engin* 1999, 39:247-253
- 22-Kalchayanand N, Sikes A, Dunne CP, Ray B: Factors Influencing Death and Injury of Foodborne Pathogens by Hydrostatic Pressure-pasteurization. *Food Microbiol* 1998, 15:207-214
- 23-Picart L, Dumay E, Guirard JP, Cheftel C: Combined High Pressure-sub-zero Temperature Processing of Smoked Salmon Mince: Phase Transition Phenomena and Inactivation of *Listeria innocua*. *J Food Engin* 2005, 68:43-56
- 24-Ting E, Balasubramaniam VM, Raghubeer E: Determining Thermal Effects in High-Pressure Processing. *Food Technol* 2002, 56(2):31-35
- 25-Ananta E, Knorr D: Pressure-induced Thermotolerance of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Research International* 2003, 36:991-997

- 26-Kalchayanand N, Dunne P, Sikes A, Ray B: Viability Loss and Morphology Change of Foodborne Pathogens Following Exposure to Hydrostatic Pressures in the Presence and Absence of Bacteriocins. *Int J Food Microbiol* 2004, 91(1):91-98
- 27-Ritz M, Freulet M, Orange N, Federighi M: Effects of High Hydrostatic Pressure on Membrane Proteins of *Salmonella typhimurium*. *Int J Food Microbiol* 2000, 55:115-119
- 28-Fasman GD: Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation. Plenum Press, New York, 1st Edition, 1989:9-10;625
- 29-Cheftel JC: High-Pressure, Microbial Inactivation and Food Preservation. *Food Sci Technol Int* 1995, 1:75
- 30-Smelt JP: Some Mechanism Aspects of Inactivation of Bacteria by High Pressure. Proceedings of European Symposium – Effects of High Pressure on Foods, University of Montpellier, 1995
- 31-Knorr D: Hydrostatic Pressure Treatment of Food Microbiology. *New Methods of Food Preservation*, Ed. Blackie Academic and Professional, New York, 1995:159
- 32-Hoover DG, Metrick C, Papineau AM, Farkas DF, Knorr D: Biological Effects of High Hydrostatic Pressure on Food Microorganisms. *Food Technol* 1989, 43:99
- 33-Masson P: Pressure Denaturation of Proteins. *High Pressure and Biotechnology*, Colloque Inserm, Ed. John Libbey Eurotext, Montrouge, France 1992, 24:89
- 34-Alpas H, Kalchayanand N, Bozoglu F, Ray B: Interactions of High Hydrostatic Pressure, Pressurization Temperature and pH on Death and Injury of Pressure-resistant and Pressure-sensitive Strains of Foodborne Pathogens. *Int J Food Microbiol* 2000, 60(1):33-42
- 35-McClements JM, Patterson MF, Linton M: The Effect of Growth Stage and Growth Temperature on High Hydrostatic Pressure Inactivation of Some Psychrotrophic Bacteria in Milk. *J Food Prot* 2001, 64:514-22
- 36-Dogan C, Erkmén O: Ultra High Hydrostatic Pressure Inactivation of *Escherichia coli* in Milk and Orange and Peach Juices. *Food Sci Technol Int* 2003, 9:403-407
- 37-Meyer RS, Cooper KL, Knorr D, Lelieveld HLM: High-Pressure Sterilization of Foods. *Food Technol* 2000, 54(11):67-72
- 38-Ponce E, Pla R, Sendra E, Guamis B, Mor-Mur M: Destruction of *Salmonella enteritidis* Inoculated in Liquid Whole Egg by High Hydrostatic Pressure: Comparative Study in Selective and Non-selective Media. *Int J Food Microbiol* 1999, 16:357-365
- 39-Vachon JF, Kheadr EE, Giasson J, Paquin P, Fliss I: Inactivation of Foodborne Pathogens in Milk Using Dynamic High Pressure. *J Food Prot* 2002, 65:345-352

- 40-Alvarez I, Mañas P, Virto R, Condón S: Inactivation of *Salmonella senftenberg* 775W by Ultrasonic Waves Under Pressure at Different Water Activities. *Int J Food Microbiol* 2006, 108:218-225
- 41-Leistner L: Combined Methods for Food Preservation. *Handbook of Food Preservation*, Ed. M Shafir Rahman. Marcel Dekker, 1999, Cap 16:457-481
- 42-Humpheson L, Adams MR, Anderson WA, Cole MB: Biphasic Thermal Inactivation Kinetics in *Salmonella enteritidis* PT4. *Appl Environ Microbiol* 1998, 64(2):459-464
- 43-Erkmen O, Karaman H: Kinetic studies of the High Pressure Carbon Dioxide Inactivation of *Salmonella typhimurium*. *J Food Engin* 2001, 50:25-28
- 44-Garriga M, Aymerich MT, Costa S, Monfort JM, Hugas M: Bactericidal Synergism Through Bacteriocins and High Pressure in a Meat Model System During Storage. *Food Microbiol* 2002, 19:509-518
- 45-Ponce E, Pla R, Sendra E, Guamis B, Mor-Mur M: Combined Effect of Nisin and High Hydrostatic Pressure on Destruction of *Listeria innocua* and *Escherichia coli* in Liquid Whole Egg. *Int J Food Microbiol* 1998, 43:15-19
- 46-Koutsoumanis K, Lambropoulou K, Nychas G-JE: A Predictive Model for the Non-thermal Inactivation of *Salmonella enteritidis* in a Food Model System Supplemented with a Natural Antimicrobial. *Int J Food Microbiol* 1999, 49:63-74
- 47-Levinson W: Medical Microbiology & Immunology – Examination & Board Review. Lange Medical Books/McGraw-Hill, 8th Edition, 2004, Cap 18:137-138
- 48-Food and Agriculture Organization of the United Nations: Risk Assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. Microbiological Risk Assessment Series, 1, 2002, in <http://www.fao.org/es/esn>, acedido a 17 de Dezembro de 2005
- 49-Pelczar MJ, Chan ECS: Elements of Microbiology. McGraw-Hill, 1981, Cap 28:480-482
- 50-Maloy S, Edwards R: *Salmonella.org* FAQ. San Diego State University, University of Tennessee 2004, in <http://salmonella.org>, acedido a 13 de Abril de 2004
- 51-Ferreira W.F.C., Sousa J.C.F: Microbiologia - Vol I. Lidel-Edições Técnicas, 1998, Cap. 15:305
- 52-Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR: Microbiologia - Conceitos e Aplicações, Vol 2. Makron Books, 2ª Edição, 1997
- 53-Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH. The Prokaryotes, Vol III. Springer-Verlag, 2nd Edition, 1992:2760
- 54-Spaisman A, Mayer A, Anthony E: *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*: Growth and Precautions. Comunicação, 2002
- 55-US Center for Disease Control - *Salmonella enteritidis*, in <http://www.cdc.gov>, acedido a 6 de Outubro de 2003

- 56-US National Institute of Allergy and Infectious Diseases - Salmonellosis, in <http://www.niaid.nih.gov/factsheets/foodbornedis.htm>, acessado a 6 de Outubro de 2003
- 57-Food Safety and Inspection Service USDA, Food and Drug Administration HHS: *Salmonella enteritidis* in Eggs - Proposed Rules. Federal Register 1998, 63(96):27502-511
- 58-University of Cornell: Salmonellosis (Public Health Concern for the Farm Family and Staff), in <http://www.news.cornell.edu/releases/Jan98/DT104facts.html>, acessado a 1 de Outubro de 2003
- 59-Bad Bug Book - *Salmonella spp*, in <http://www.cfsan.fda.gov>, acessado a 6 de Outubro de 2003
- 60-Prescott, Harley, Klein: Microbiology. MacGraw-Hill, 4th Edition, 1999, Cap 37:791-793
- 61-Grijpspeerdt K, Kreft JU, Messens W: Individual-based Modelling of Growth and Migration of *Salmonella enteritidis* in Hens' Eggs. Int J Food Microbiol 2005, 100:323-333
- 62-Food Safety and Inspection Service USDA: *Salmonella enteritidis* Risk Assessment - Shell Eggs and Egg Products. Final Report 1998, in <http://www.fsis.usda.gov/OPHS/risk/contents.html>, acessado a 16 de Maio de 2004
- 63-Mattick KL, Rowbury RJ, Humphrey TJ: Morphological Changes to *Escherichia coli* 0157:H7, commensal *E. coli* and *Salmonella spp* in Response to Marginal Growth Conditions, With Special Reference to Mildly Stressing Temperatures. Sci Prog 2003, 86:103-113
- 64-Toledo PS, "Descrição do comportamento da cepa de *Salmonella enteritidis* PT4 frente ao tratamento térmico a 60,0°C por três minutos e meio, em ovo integral pasteurizado desidratado reconstituído", Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo 2003, in <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-14052004-083711/>, acessado a 19 de Outubro de 2004
- 65-Solano C, Sesma B, Álvarez M, Dorronsor I, Diaz R, Urdaneta E, Gamazo C: Diferenciación de Cepas Virulentas de *Salmonella enteritidis* - Aplicación al Diagnóstico Clínico y al Control Sanitario, in <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol22/suple3/suple12.html>, acessado a 15 de Abril de 2004



- 66-Agência Portuguesa de Segurança Alimentar, in [http://www.hisa.pt/InforHisa/Geral\\_SegurançaAlimentar.htm](http://www.hisa.pt/InforHisa/Geral_SegurançaAlimentar.htm), acedido a 21 de Janeiro de 2005
- 67-Divisão de Epidemiologia da Direcção de Serviços de Informação e Análise: Doenças de Declaração Obrigatória 2000-2004. Direcção Geral da Saúde, 2005
- 68-Suresh T, Hatha AAM, Sreenivasan D, Sangeetha N, Lashmanaperumalsamy P: Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella enteritidis* and other *Salmonellas* in the Eggs and Egg-storing Trays from Retails Markets of Coimbatore, South India. Food Microbiol 2006, 23:294-299
- 69-Prescott, Harley, Klein: Microbiology. MacGraw-Hill, 4th Edition, 1999, Cap 22:477-480
- 70-Bourgeois CM, Mescle JF, Zucca J. Microbiologie Alimentaire, Vol I - Aspect Microbiologique de la Sécurité et de la Qualité Alimentaires. Apria, 2ème Ed., 1990:51
- 71-Price RJ, Tom PD: Environmental Conditions for Pathogenic Bacterial Growth. University of California, Food Science & Technology 1995, in <http://www.seafood.ucdavis.edu/Pubs/pathogen.htm>, acedido a 13 de Abril de 2004
- 72-Wilks C, Parkinson G, Young P: International Review of *Salmonella enteritidis* (SE) Epidemiology and Control Policies. Report for Rural Industries Research and Development Corporation 2000, RIRDC Publication No 00/145, in <http://www.rirdc.gov.au/reports/eggs/00-145.pdf>, acedido a 10 de Agosto de 2003
- 73-Grijspeerdt K, Herman L: Inactivation of *Salmonella enteritidis* During Boiling of Eggs. Int J Food Microbiol 2003, 82:13-24
- 74-Messens W, Dubocage L, Grijspeerdt K, Heyndrickx M, Herman L: Growth of *Salmonella* serovars in Hens' Egg Albumen as Affected by Storage Prior to Inoculation. Food Microbiol 2004, 21:25-32
- 75-Nygård K, Jong B, Guerin P, Andersson Y, Olsson, A, Giesecke J: Emergence of New *Salmonella enteritidis* Phage Types in Europe? Surveillance of Infections in Returning Travellers. BMC Medicine 2004, 2: 32
- 76-Belitz, Grosch, Schieberle: Food Chemistry. Springer, 3rd Revised Edition, 2004, Cap 11:551-565
- 77-Okubo T, Akachi S, Hatta H: Structure of Hen Eggs and Physiology of Egg Laying. Hen Eggs - Their Basic and Applied Science. Ed. Yanamoto, Juneja, Hatta, Kim, CRC Press, 1997, Cap 1:3-12

- 78-Stadelman WJ: The Egg Industry. Egg Science and Technology. Ed. Stadelman, Cotterill, Haworth Press, 4th Edition, 1995, Cap 1:1-7
- 79-Campbell L, Raikos V, Euston SR: Heat Stability and Emulsifying of Whole Egg and Egg Yolk as Related to Heat Treatment. Food Hydrocolloids 2005, 19(3):533-539
- 80-Sugino H, Nitoda T, Juneja LR: General Chemical Composition of Hen Eggs. Hen Eggs - Their Basic and Applied Science. Ed. Yanamoto, Juneja, Hatta, Kim, CRC Press, 1997, Cap 2:13-24
- 81-Board RG, Tranter HS: The Microbiology of Eggs. Egg Science and Technology. Ed. Stadelman, Cotterill, Haworth Press, 4th Edition, 1995, Cap 5:81-103
- 82-Li-Chan ECY, Powrie WD, Nakai S: The Chemistry of Eggs and Egg Products. Egg Science and Technology. Ed. Stadelman, Cotterill, Haworth Press, 4th Edition, 1995, Cap 6:105-176
- 83-Castellani O, Dubiard CG, Briand ED, Anton M: Influence of Physicochemical Conditions and Technological Treatments on the Iron Binding Capacity of Egg Yolk Phosvitin. Food Chem 2004, 85:569-577
- 84-Cotterill OJ: Egg-Products Industry. Egg Science and Technology. Ed. Stadelman, Cotterill, Haworth Press, 4th Edition, 1995, Cap 9:221-258
- 85-Cunningham FE: Egg-Product Pasteurization. Egg Science and Technology. Ed. Stadelman, Cotterill, Haworth Press, 4th Edition, 1995, Cap 12:289-317
- 86-Kobayashi M, Gutierrez MA, Hatta H: Microbiology of Eggs. Hen Eggs - Their Basic and Applied Science. Ed. Yanamoto, Juneja, Hatta, Kim, CRC Press, 1997, Cap 12:179-191
- 87-Grijspeerdt K: Modelling the Penetration and Growth of Bacteria in Eggs. Food Control 2001, 12:7-11
- 88-Reu K, Grijspeerdt K, Heyndrickx M, Uyttendaele M, Herman L: The Use of Total Aerobic and Gram-negative Flora for Quality Assurance in the Production of Consumption Eggs. Food Control 2005, 16:147-155
- 89-Griffiths MW: Issues Related to the Safety of Eggs and Egg Products, in <http://www.veterinaria.uchile.cl/publicacion/VIIIPatologia/seminarios/semi10.pdf>, acedido a 15 de Abril de 2005
- 90-McMullin PF, Gooderham KR, Hayes G: A Commercial *Salmonella enteritidis* Elisa Test: Results Arising for its Use in Monitoring for Infection and Response to an Inactivated Vaccine. Communication at the World Veterinary Poultry Association Congress, Budapest, 1997
- 91-Institute of Food Technologists: Next Steps in Food Safety Management, Expert Report, 2002, in <http://www.ift.org/pdfs/expert/microfs/nextsteps.pdf>, acedido a 2 de Janeiro de 2005

- 92-Chantarapanont W, Slustsker L, Tauxe RV, Beauchat LR: Factors Influencing Inactivation of *Salmonella enteritidis* in Hard-cooking Eggs. J Food Prot 2000, 63(1):36-43
- 93-Colorado State University Cooperative Extension: Hard-Cooking Eggs to Minimize *Salmonella enteritidis*. Safefood News 2000, Vol 4, No 3, in <http://www.colostate.edu/orgs/safefood/newsltr/v4n3s02.html>, acedido a 13 de Abril de 2004
- 94-Curtis PA, Anderson KE, Jones FT: Designing a HACCP Plan for Shell Egg Processing Plants. North Carolina State University, Department of Food Science 2004, in <http://www.ces.ncsu.edu/depts/foodsci/ext/pubs/haccp2.html>, acedido a 13 de Abril de 2004
- 95-Blackburn CW, Curtis LM, Humpheson L, Billon C, McClure PJ: Development of Thermal Inactivation Models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* 0157:H7 with Temperature, pH and NaCl as Controlling Factors. Int J Food Microbiol 1997, 38 (1):31-44
- 96-Mattick K, Durham K, Domingue G, Jørgensen F, Sem M, Schaffner DW, Humphrey T: The Survival of Foodborne Pathogens During Domestic Washing-up and Subsequent Transfer onto Washing-up Sponges, Kitchen Surfaces and Food. Int J Food Microbiol 2003, 85:213-226
- 97-Bradford MA, Humphrey TJ, Lappin-Scott HM: The Cross-contamination and Survival of *Salmonella enteritidis* PT4 on Sterile and Non-sterile Foodstuffs. Letters in Appl Microbiol 1997, 24:261-264
- 98-Durance TD: Separation, Purification, and Thermal Stability of Lysozyme and Avidin from Chicken Egg White. Egg Uses and Processing Technologies - New Developments. Ed. Sim, Nakai, Cab International, 1994, Cap 7:77-84
- 99-Jorge MN, Ribeiro I, Serrano P: A Produção de Ovos em Portugal, Espanha e França – Caracterização do Sector, Custos de Produção e Desafios Colocados pela Directiva 1999/74/CE. 2004, in <http://www.apdea.pt>, acedido a 21 de Janeiro de 2005
- 100- Sítio oficial da Derovo, in [www.ddo-ovoproduto.com](http://www.ddo-ovoproduto.com), acedido a 15 de Abril de 2005
- 101- Hung YC: High Temperature and High Pressure Pasteurization for Elimination of *Salmonella* and *Listeria* in Liquid Egg Products. University of Geórgia, 1997, in [http://foodpac.gatech.edu/\\_annual/98/fp\\_annual\\_report.htm](http://foodpac.gatech.edu/_annual/98/fp_annual_report.htm), acedido a 4 de Maio de 2004

- 102- Hatta H, Hagi T, Hirano K: Chemical and Physiochemical Properties of Hen Eggs and Their Application in Foods. Hen Eggs - Their Basic and Applied Science. Ed. Yanamoto, Juneja, Hatta, Kim, CRC Press, 1997, Cap 8:117-131
- 103- Mañas P, Pagán R, Alvarez I, Usón SC: Survival of *Salmonella senftenberg* 775W to Current Liquid Whole Egg Pasteurization Treatments. Food Microbiol 2003, 20:593-600
- 104- Portaria nº 1009/93 de 12 de Outubro, in [http://www.diramb.gov.pt/basedoc/TXT\\_LN\\_5439\\_3\\_0001.htm](http://www.diramb.gov.pt/basedoc/TXT_LN_5439_3_0001.htm), acedido a 29 de Setembro de 2003
- 105- Higgins KT: Asepsis Reconsidered. Food Engineering 2000, in <http://www.foodengineeringmag.com>, acedido a 1 de Outubro de 2003
- 106- Henry C: Ultrapasteurized and Pasteurized Food - Milk and Shell Eggs with Extended Shelf Lives. Chemical and Engineering News 2001, Volume 79, No 45, in <http://www.pubs.acs.org>, acedido a 1 de Outubro de 2003
- 107- Yuste J, Pla R, Mor-Mur M: *Salmonella enteritidis* and Aerobic Mesophiles in Inoculated Poultry Sausages Manufactured With High-Pressure Processing. Letters in Appl Microbiol 2000, 31(5):374-377
- 108- Lee DU, Heinz V, Knorr D: Effects of Combination Treatments of Nisin and High-Intensity Ultrasound with High Pressure on the Microbial Inactivation in Liquid Whole Egg. Inn Food Sci and Emerging Technol 2003, 4:387-393
- 109- Ponce E, Pla R, Mor-Mur M, Gervilla R, Guamis B: Inactivation of *Listeria innocua* Inoculated in Liquid Whole Egg by High Hydrostatic Pressure. J Food Prot 1998, 61:119-122
- 110- Lee DU, Heinz V, Knorr D: Biphasic Inactivation of *Escherichia coli* in Liquid Whole Egg by High Hydrostatic Treatments. Biotechnol Prog 2001, 17:1020-5
- 111- Lee DU, Heinz V, Knorr D: Evaluation of Processing Criteria for the High Pressure Treatment of Liquid Whole Egg - Rheological Study. Lebensm.-Wiss. u. - Technol 1999, 32:299-304
- 112- Alpas H, Lee J, Bozoglu F, Kaletunç G: Evaluation of High Hydrostatic Pressure Sensivity of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 by Differential Scanning Calorimetry. Int J Food Microbiol 2003, 87:229-237
- 113- Alpas H, Kalchayanand N, Bozoglu F, Sikes A, Dunne CP, Ray B: Variation in Resistance to Hydrostatic Pressure Among Strains of Food-Borne Pathogens. Appl Environ Microbiol 1999, 65(9):4248-4251
- 114- Sizer CE, Balasubramaniam VM, Ting E: Validating High-Pressure Processes for Low-Acid Foods. Food Technol 2002, 56(2):36-41

- 115- Knorr D, in Barbosa-Cánovas GV, Gould GW: Food Preservation Technology Series - Innovations in Food Processing. Technomic 2000, Cap 2:13-30
- 116- Sherry AE, Patterson MF, Madden RH: Comparison of 40 *Salmonella enterica* serovars Injured by Thermal, High-pressure and Irradiation Stress. J Appl Microbiol 2004, 96(4):887
- 117- Erkmén O, Doğan C: Kinetic Analysis of *Escherichia coli* Inactivation by High Hydrostatic Pressure in Broth and Foods. Food Microbiol 2004, 21:181-185
- 118- Balasubramaniam VM: High Pressure Processing of Low Acid Foods - A Pilot Study. National Center for Food Safety and Technology, in <http://www.ncfst.iit.edu/HPP/DUST.htm>, acedido a 20 de Janeiro de 2005
- 119- Foods of Tomorrow - High Pressure Processing, 2000, in <http://www.foodprocessing.com>, acedido a 1 de Outubro de 2003
- 120- Virginia Tech Laboratory and Virginia Sea Grant College Program: High Pressure Processing Fact Sheet, 2005, in <http://www.hpp.vt.edu>, acedido a 25 de Março de 2005
- 121- Ananta E, Heinz V, Knorr D: Assessment of High Pressure Induced Damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by Flow Cytometry. Food Microbiol 2004, Vol 21:567-577
- 122- Waites M, Morgan N, Rockey J, Histon G: Industrial Microbiology - An Introduction. Blackwell Science, 1st Edition, 2001:7-45
- 123- Bozoglu F, Alpas H, Kaletunc G: Injury Recovery of Foodborne Pathogens in High Hydrostatic Pressure Treated Milk During Storage. Immunol Med Microbiol 2004, 40:243-247
- 124- Peck M, George S: Safety Margins and Sub-lethal Damage, in [http://www.bbsrc.ac.uk/news/features/99apr/99\\_04\\_safety.html](http://www.bbsrc.ac.uk/news/features/99apr/99_04_safety.html), acedido a 13 de Abril de 2004
- 125- Xiong R, Xie G, Edmondson AE, Sheard MA: A Mathematical Model for Bacterial Inactivation. Int J Food Microbiol 1999, 46:45-55
- 126- Gardner, WP: Statistical Analysis Methods for Chemists - A software-based approach. Ed. Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1997, Cap 5:186-188
- 127- Box, George EP: Statistics for Experimenters: Design, Discovery and Innovation. Ed. Stuart Hunter, William G Hunter. John Wiley & Sons, 2005:612-613
- 128- Hashizume C, Kimura K, Hayashi R: Kinetic Analysis of Yeast Inactivation by High Pressure Treatments at Low Temperatures. Biosci Biotech Biochem 1995, 59:1455-1458

- 129- Euzéby JP: List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature, Approved Lists of Bacterial Names, *in* <http://www.bacterio.cict.fr/salmonellanom.html>, acedido a 18 de Setembro de 2006
- 130- Patterson MF, Quinn M, Simpson R, Gilmour A: Sensitivity of Vegetative Pathogens to High Hydrostatic Pressure Treatment in Phosphate Buffered Saline and Foods. J Food Prot 1995, 58: 524-9